

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE P97<sub>C</sub> DE *MYCOPLASMA*  
*HYOPNEUMONIAE* : UNE MOLÉCULE POTENTIELLEMENT ADJUVANTE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CRISTELLE KARAM

FÉVRIER 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Pour débiter ce mémoire, il m'est très important de remercier le département des sciences biologiques de l'UQAM qui m'a accueillie et permis de réaliser ce projet dans son établissement, ainsi que le centre de recherche Biomed et le centre de recherche en infectiologie porcine et avicole CRIPA de l'université de Montréal.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui m'ont entouré pendant ma maîtrise, tout particulièrement mon directeur de recherche Denis Archambault pour son encadrement et son appui ainsi que ma co-directrice Mariella Segura pour ses conseils.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire pour leur motivation, le temps qu'ils m'ont consacré, les discussions scientifiques et surtout les beaux moments qu'on a passé ensemble. Je tiens à remercier aussi mon collègue Monsieur Benoît Bélanger qui a pris le temps de répéter les expériences de stimulation afin d'écrire un beau mémoire ainsi que de participer à la correction du mémoire.

Enfin, un très grand merci à mes parents, Elie et Najla, et mes sœurs Elige et Nathalie pour leur appui et leurs encouragements malgré la distance qui nous sépare. Je leur dédie ce mémoire. Je dédie aussi ce mémoire à l'âme de mon très cher oncle qui a toujours été fier de moi.

Je vous aime.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xv
RÉSUMÉ .....	xvii
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I .....	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
1.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	3
1.1.1 Généralités et impact économique.....	3
1.1.2 Organisme.....	3
1.1.3 Mode de transmission.....	6
1.1.4 Symptômes et pathogénécité .....	6
1.1.5 Traitement.....	7
1.1.6 Protéines d'adhésion.....	7
1.1.6.1 La protéine P97 .....	8
1.1.6.2 Autres protéines d'adhésion de <i>M. hyopneumoniae</i> .....	11
1.2 La réponse immunologique: de l'immunité innée à l'immunité adaptative.....	12
1.3 Les récepteurs Toll-Like (TLRs) et leurs ligands .....	14
1.3.1 TLRs 1, 2, 6 et 10 .....	15
1.3.2 TLR 4 .....	16
1.3.3 TLR 5 .....	18
1.3.4 TLR 3 .....	18
1.3.5 TLR 7/8 .....	19
1.3.6 TLR 9 .....	19
1.3.7 TLR 11 .....	20
1.3.8 TLR 13 .....	20
1.4 Les récepteurs NOD-like (NLRs) .....	22
1.5 Les vaccins conventionnels et les vaccins sous-unitaires .....	24
1.6 Les adjuvants .....	26



1.6.1	Les adjuvants à base de sels minéraux .....	27
1.6.1.1	L'hydroxyde d'aluminium .....	27
1.6.1.2	Autres sels minéraux adjuvants.....	28
1.6.2	Adjuvants tensioactifs .....	28
1.6.3	Adjuvants de dérivés bactériens .....	29
1.6.4	Émulsions .....	29
1.6.5	Liposomes, virosomes et nanoparticules .....	31
1.6.6	Cytokines en tant qu'adjuvants.....	32
1.6.7	Polysaccharides en tant qu'adjuvants .....	33
1.6.8	Adjuvants mucosaux .....	33
1.6.9	Adjuvants à base d'acides nucléiques .....	34
1.7	Hypothèses et objectifs .....	35
CHAPITRE II .....		36
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		36
2.1	Clonage du gène P97c dans le vecteur pET-21b (+).....	36
2.1.1	Digestion du vecteur pET-21b (+) et du gène P97c par les enzymes de restriction Eco RI et XhoI.....	36
2.1.2	Purification des produits de digestion .....	37
2.1.3	Ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-21b (+) digéré.....	37
2.1.4	Transformation bactérienne par le produit de ligation .....	37
2.1.5	Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries <i>E. coli</i> DH5α .....	38
2.1.6	Transformation bactérienne des bactéries <i>E. coli</i> Rosetta-Gami.....	39
2.1.7	Vérification de la présence du plasmide dans les bactéries <i>E. coli</i> Rosetta Gami...39	
2.1.8	Production de la protéine recombinante P97c dans les bactéries <i>E. coli</i> Rosetta Gami .....	40
2.1.9	Analyse par immunobuvardage des surnageants des bactéries <i>E. coli</i> Rosetta Gami induites et non induites.....	40
2.1.10	Purification d'extraits de protéines sur une colonne de résine chargée-Ni avec affinité à l'étiquette Histidine .....	42
2.1.11	Analyse par immunobuvardage des produits de purification.....	42
2.2	Clonage du gène P97c dans le vecteur pET-22b (+).....	42
2.2.1	Amplification du gène synthétique de P97c par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	42
2.2.2	Purification du produit de PCR .....	43

2.2.3	Digestion du vecteur pET-22b (+) et du gène P97c de la PCR par les enzymes de restriction XhoI et NcoI.....	43
2.2.4	Ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-22b (+) digéré.....	44
2.2.5	Transformation des bactéries <i>E. coli</i> DH5α par le produit de ligation.....	44
2.2.6	Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries <i>E. coli</i> DH5α.....	44
2.2.7	Transformation bactérienne des bactéries <i>E. coli</i> BL21 DE3.....	45
2.2.8	Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries <i>E. coli</i> BL21 DE3.....	45
2.2.9	Production de la protéine recombinante P97c par induction des bactéries <i>E. coli</i> BL21 DE3.....	45
2.2.10	Lyse périplasmique des bactéries induites.....	46
2.2.11	Lyse totale et sonication des bactéries induites.....	46
2.2.12	Purification des lysats sur une colonne de résine chargée-Ni avec affinité à l'étiquette Histidine.....	47
2.2.13	Analyse par immunobuvardage des produits de purification.....	47
2.2.14	Chromatographie d'exclusion stérique.....	47
2.2.15	Dosage des protéines.....	48
2.2.16	Dichroïsme circulaire (CD).....	48
2.3	Génération de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BmDCs) de souris C57BL/6 et leurs activation.....	49
2.4	Cytométrie en flux.....	50
2.5	Quantification des cytokines IL-6 et TNF-α.....	50
2.6	Analyse statistique.....	51
	CHAPITRE III.....	52
	RÉSULTATS.....	52
3.1	Expression du gène codant la P97c par le vecteur pET-21b (+).....	52
3.2	Expression du gène codant la P97c par le vecteur pET-22b (+).....	55
3.3	Purification d'extrait protéique provenant de la lyse totale.....	59
3.4	Séparation par chromatographie d'exclusion stérique.....	60
3.5	Analyse structurale par dichroïsme circulaire.....	62
3.6	Effet de P97c (37 kDa) sur la sécrétion d'IL-6 et TNF-α dans des cellules dendritiques murines.....	63
	CHAPITRE IV.....	68
	DISCUSSION.....	68
	CONCLUSION.....	79

ANNEXE A .....	80
ANNEXE B .....	82
ANNEXE C .....	84
RÉFÉRENCES .....	86

## LISTE DES FIGURES

1. Organisation génomique de <i>M. hyopneumoniae</i> 232 .....	5
2. Portion C-terminale des motifs répétés de la protéine P97 (P97c) des régions R1 et R2 .....	9
3. Analyse des paralogues de la P97 et la P102 chez <i>M. hyopneumoniae</i> .....	11
4. Les récepteurs Toll-like et leurs voies de signalisation .....	15
5. Structure des membres de la famille des NLRs .....	24
6. Expression de la protéine P97c dans les bactéries d' <i>E. coli</i> Rosetta Gami transformées avec le vecteur pET-21b (+) .....	54
7. Expression de la protéine P97c dans les bactéries <i>E. coli</i> BL21 DE3 transformées avec le vecteur pET-22b (+) .....	58
8. Purification des protéines de la lyse totale .....	59
9. Séparation des deux formes majeures de P97c exprimées à partir du vecteur pET-22b (+) par chromatographie d'exclusion stérique.....	62
10. Spectres de spectroscopie de dichroïsme circulaire de la P97c .....	63
11. Effet de la P97c complète sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires .....	67
12. Séquences codant la P97c clonées dans les vecteurs pET-21b (+) et pET-22b (+) .....	81
13. Carte du vecteur pET-21b (+) .....	82
14. Carte du vecteur pET-22b (+) .....	83



## LISTE DES TABLEAUX

1. Les TLRs, leurs ligands et leurs voies de signalisation .....	21
2. Les NLRs, leurs ligands et leurs voies de signalisation .....	24



## LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine diphosphate  
AdVs : Adénovecteurs  
Alun: Aluminium  
ANOVA : *Analysis of variance*  
AP-1 : Protéine activatrice-1  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomal  
ARNr 23S : ARN ribosomal 23S  
ARNt : ARN de transfert  
ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCG : Bacille Calmette-Guérin  
BCR : *B-cell receptor*  
BIR : Inhibiteur de baculovirus  
BLP : Lipopeptide bactérien  
BmDCs : *Bone marrow dendritic cells*  
BSA : *Bovine serum albumin*  
Cap : Capside  
CARD : Domaine de recrutement de caspase  
CD : Dichroïsme circulaire  
CIITA : *MCH class II transcription activator*  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CPAs : Cellules présentatrices d'antigènes  
CpG ODN : Oligodesoxynucléotide synthétique  
CpG : C-phosphate-G  
Ct : *Cholera toxin*  
C-terminale : Carboxy-terminale  
DA : Domaine acide  
DAP : Acide diaminopimélique  
DC : Cellules dendritiques  
DMSO : Diméthyle Sulfoxyde  
DO : Densité optique  
dsARN : ARN double brin  
DTP : *Diphtheria-Tetanus-Pertussis*  
E : Éluion  
*E. coli* : *Escherichia coli*  
E/H : Eau/Huile  
ECL : *Enhanced chemiluminescence*  
EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique  
ELISA : *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*  
FBS : Sérum de veau fœtal  
FliC : Flagelline  
FT : *Flow through*  
GAGs : Glycosaminoglycans  
GM-CSF : *Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor*  
GP-5 : Glycoprotéine 5  
GST : Glutathione S-transférase  
H/E : Huile/Eau  
HA : Hémagglutinine  
HET-E : *Incompatibility locus protein from Podospora anserine*  
His-tag : Etiquette Histidine

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine  
 HRP : *Horseradish peroxidase*  
 I : Induit  
 I/CFA : Adjuvant incomplet/complet de Freund  
 IFN : Interféron  
 Ig : Immunoglobuline  
 IgAs : IgA de surface  
 IKK :  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinase  
 IL : Interleukine  
 IL-1 R : *Interleukine-1 receptor*  
 IPAF : *ICE-protease activating factor*  
 IPTG : Isopropylthio- $\beta$ -galactoside  
 IRAK : *IL-1 R associated kinase*  
 IRF : *Interferon regulatory factor*  
 IRIVs : *Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*  
 ISCOMs : *Immune stimulating complexes*  
 $\text{I}\kappa\text{B}$  : Protéine inhibitrice  $\kappa\text{B}$   
 JNK : *c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*  
 L : Lavage  
 L-B : *Luria Broth*  
 LB : Lymphocyte B  
 LPS : Lipopolysaccharide  
 LRR : Répétitions riches en leucine  
 LT : Lymphocyte T  
 Lt : *Heat-labile enterotoxin*  
*M. hyopneumoniae* : *Mycoplasma hyopneumoniae*  
 m/z : Masse/charge  
 Mal : *MyD-88 adaptor like*  
 MALP-2 : *Macrophage activating lipopeptide-2*

MAPK : *mitogen-associated protein kinase*  
 MD-2 : *Myeloid differentiation factor-2*  
 MDP : Muramyl dipeptide  
 MEC : Matrice extracellulaire  
 MPI : Microparticules d'inuline  
 MPL : *Monophosphoryl lipid A*  
 MS : Spectrométrie de masse  
 MyD-88 : *Myeloid differentiation factor-88*  
 NACHT : *Domain present NAIP, CIITA, HET-E and TP1*  
 NaCl : Chlorure de sodium  
 NAIP : *Neuronal apoptosis inhibitor protein*  
 NALP : *NACHT-, LR-R, PYD-containing domain*  
 NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor  $\kappa$ B*  
 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  : Bicarbonate d'ammonium  
 Ni : Nickel  
 NI : Non induit  
 NK : Cellules tueuses naturelles  
 NLR : *Nod-like receptor*  
 NOD : *Nucleotide oligomerization domain*  
 NP-40 : Nonidet-P 40  
 NS : Non stimulé  
 N-terminale : Amino-terminale  
 ORF : Cadre de lecture ou *Open reading frame*  
 OVA: Ovalbumine  
 PAMPs : *Pathogen- Associated Molecular Patterns*  
 PBS : *Phosphate buffer saline*  
 PCR : *Polymerase chain reaction*  
 pDC : Cellules dendritiques plasmocytaires  
 PEP : Pneumonie enzootique porcine

PGN : Peptidoglycans

PLGA : Acide poly-lactide-co-glycolide

Poly I:C : Acide polyinosinique-polycytidilique

PRR : *Pattern recognition receptor*

PRRSV : Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

PYD : domaine pyrine

qRT PCR : *Real time reverse transcriptase-quantitative*

QS-21 : *Quillaja Saponaria- 21*

R1 : Région 1

R2 : Région 2

rAdP97c : Adénovirus recombinants défectifs pour la réplication exprimant la portion C-terminale de la P97.

rAdVs : Adénovecteurs recombinants

RIG-I : *Retinoic acid-inducible gene I*

RLRs : *RIG-I-like receptor*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

*S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SOB : *Super Optimal Broth*

ssARN : ARN simple brin

*T. gondii* : *Toxoplasma gondii*

TCR : *T-cell receptor*

TICAM : *TIR-containing adaptor molecule 1*

TIR : *Toll/Interleukine-1 Receptor*

TIRAP : *TIR domain-containing adaptor protein*

TLR : *Toll-like receptor*

TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF : *Tumor necrosis factor*

TP-1 : *Telomerase associated protein*



TRAF : *TNF receptor-associated factor*

TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF : *TIR containning adaptor protein*

UNC93B : *Unc-93 homolog B*

UV : Ultraviolet

$\alpha$ -P97 :Anti-P97

## LISTE DES SYMBOLES

% : Pourcentage  
/ : Barre oblique  
® : Marque déposée  
°C : Degré Celsius  
1X : Une fois  
cm<sup>2</sup> : Centimètre carré  
dmol : Décimole  
g : Force g  
Kb : Kilobase  
kDa : Kilo Dalton  
Km : Kilomètre  
L : Litre  
M : Molaire  
mA : milliampère  
mdegré : milli degré  
mg : Milligramme  
ml : Millilitre  
mM : Millimolaire  
ng : Nanogramme  
nm : Nanomètre  
P : Protéine  
Rpm : Rotation par minute  
U: Unité  
V : Volt  
α : Alpha

$\beta$  : Bêta

$\gamma$  : Gamma

$\kappa$  : Kappa

$\mu\text{g}$  : Microgramme

$\mu\text{l}$  : Microlitre

$\mu\text{m}$  : Micromètre

$\mu\text{M}$  : Micromolaire

## RÉSUMÉ

Les adjuvants sont des composés qui peuvent augmenter et/ou moduler la réponse immunologique contre une molécule immunogène. La protéine P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* a été caractérisée comme étant une protéine assurant l'adhésion de cet organisme aux cellules ciliées des voies respiratoires chez le porc favorisant le développement de la pneumonie enzootique. Des études précédentes ont montré que la portion C-terminale de la P97 (P97c), lorsque couplée à d'autres protéines immunogènes et délivrée *in vivo* avec des adénovecteurs, augmente la réponse en anticorps contre ces immunogènes, ce qui suggère un effet adjuvant de la P97c. La protéine recombinante P97c a été produite afin de déterminer son rôle potentiellement adjuvant. Dans cette optique, le gène codant la P97c a été cloné dans le vecteur pET-21b (+). L'expression de la protéine a été réalisée dans des bactéries Rosetta Gami transformées par le vecteur pET-21b (+) et les conditions optimales de culture pour l'expression ont été déterminées. Peu importe les conditions utilisées, l'expression de la protéine générait de nombreuses formes tronquées de la P97c. La séquence codant la P97c a été alors clonée dans le vecteur pET-22b (+), permettant d'introduire une séquence d'exportation vers le périplasme. L'expression de la P97c a été réalisée dans les bactéries BL21 DE3 transformées par le vecteur pET-22b (+) tout en déterminant les conditions optimales de culture pour l'expression. Les résultats ont démontré que deux formes de la P97c (la complète et une tronquée) ont été retrouvées dans la fraction périplasmique des bactéries induites. Suite à leur purification, les deux formes de la protéine ont pu être séparées par chromatographie d'exclusion stérique, ce qui a permis d'obtenir la P97c recombinante entière seule et en quantité suffisante pour des études de caractérisation de l'activité biologique *in vitro* et ultérieurement *in vivo*. Ces deux formes ont été analysées par un test de dichroïsme circulaire qui a montré une structure désordonnée pour la forme complète et une structure partiellement hélicoïdale pour la protéine tronquée. L'activité biologique de P97c a été déterminée en exposant des cellules dendritiques de souris C57BL/6 à différentes doses de la protéine. Puis un test d'ELISA a été effectué pour la mesure des cytokines. Le niveau de l'Interleukine-6 (IL-6) a augmenté graduellement avec l'augmentation de la concentration de la P97c en présence et en absence de polymyxine B. Le *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) a été aussi détecté par la stimulation des cellules dendritiques avec la P97c en présence et en absence de polymyxine B.

MOTS CLÉS : *Mycoplasma hyopneumoniae*, P97c, Vaccin, Adjuvant, Expression, Chromatographie d'exclusion stérique, Dichroïsme circulaire.



## INTRODUCTION

La vaccination a comme but de générer une réponse immunitaire offrant une protection à long terme contre l'infection. Même si la vaccination a permis d'améliorer l'état de santé des populations humaines et animales dans le monde, plusieurs maladies infectieuses demeurent sans vaccins. Contrairement aux vaccins vivants atténués, les vaccins à base d'organismes entiers tués ou les vaccins sous-unitaires nécessitent généralement l'ajout d'un adjuvant pour être efficaces. Les adjuvants sont des composés qui augmentent ou orientent la réponse immunitaire contre des antigènes co-administrés (Aguilar and Rodriguez, 2007). Les vaccins conventionnels sont à base d'organismes entiers vivants atténués ou inactivés par un processus chimique. Cependant, la réapparition de la virulence dans les vaccins atténués ou l'inactivation incomplète et la faible réponse immunitaire dans les vaccins conventionnels, sont des inconvénients auxquels font face les intervenants en santé (Gregoriadis, 1998). Ainsi, le développement de vaccins à base de protéines recombinantes ou encore de vecteurs qui, lorsqu'administrés, peuvent produire chez l'individu les protéines immunisantes d'intérêt sont des stratégies qui permettent d'éliminer les inconvénients des vaccins conventionnels (Liljeqvist and Ståhl, 1999). Or, dans l'un ou l'autre cas, avec l'utilisation d'un adjuvant immunitaire de choix, moins d'antigènes et moins d'injections sont nécessaires pour induire des réponses immunitaires optimales (Brunner et al., 2010).

Actuellement, la majorité des adjuvants approuvés pour l'usage humain sont à base de sels d'aluminium (Alun) (Pepponi et al., 2013). Ces derniers présentent le désavantage d'induire une réponse immune de type Th1 (cellulaire) limitée, laquelle est essentielle pour la protection contre plusieurs pathogènes intracellulaires (Brunner et al., 2010; Lefebvre et al., 2003). Il est donc important de développer de nouveaux adjuvants.



La protéine P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), l'agent étiologique de la pneumonie enzootique du porc, est impliquée dans l'adhésion microbienne au niveau des cils de l'épithélium du tractus respiratoire et de la matrice extracellulaire via deux régions, R1 et R2, situées dans sa portion C-terminale. Les régions R1 et R2 contiennent plusieurs répétitions des motifs AAKPV/E et GTPNQGKKA, respectivement. Des études précédentes ont démontré que la partie C-terminale de P97 (P97c), lorsque fusionnée avec des protéines d'origine virale [les protéines étant produites *in vivo* via des adénovecteurs (AdVs)], a augmenté de manière substantielle la réponse en anticorps spécifiques de ces protéines virales dans un modèle murin, suggérant un effet adjuvant de P97c (Roques et al., 2013). Les profils de réponses en anticorps obtenus étaient de types Th2 (IgG1) et Th1 (IgG2a, IgG2b, IgG3), indiquant l'induction d'une réponse mixte Th1/Th2.

Dans cette étude, le gène codant la P97c a été cloné dans deux vecteurs d'expression, pET-21b (+) et pET-22b (+), dans le but d'exprimer et de purifier la protéine P97c. La protéine a été ensuite analysée pour sa capacité d'induire la production de cytokines immunitaires par les cellules dendritiques (DCs).

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*:

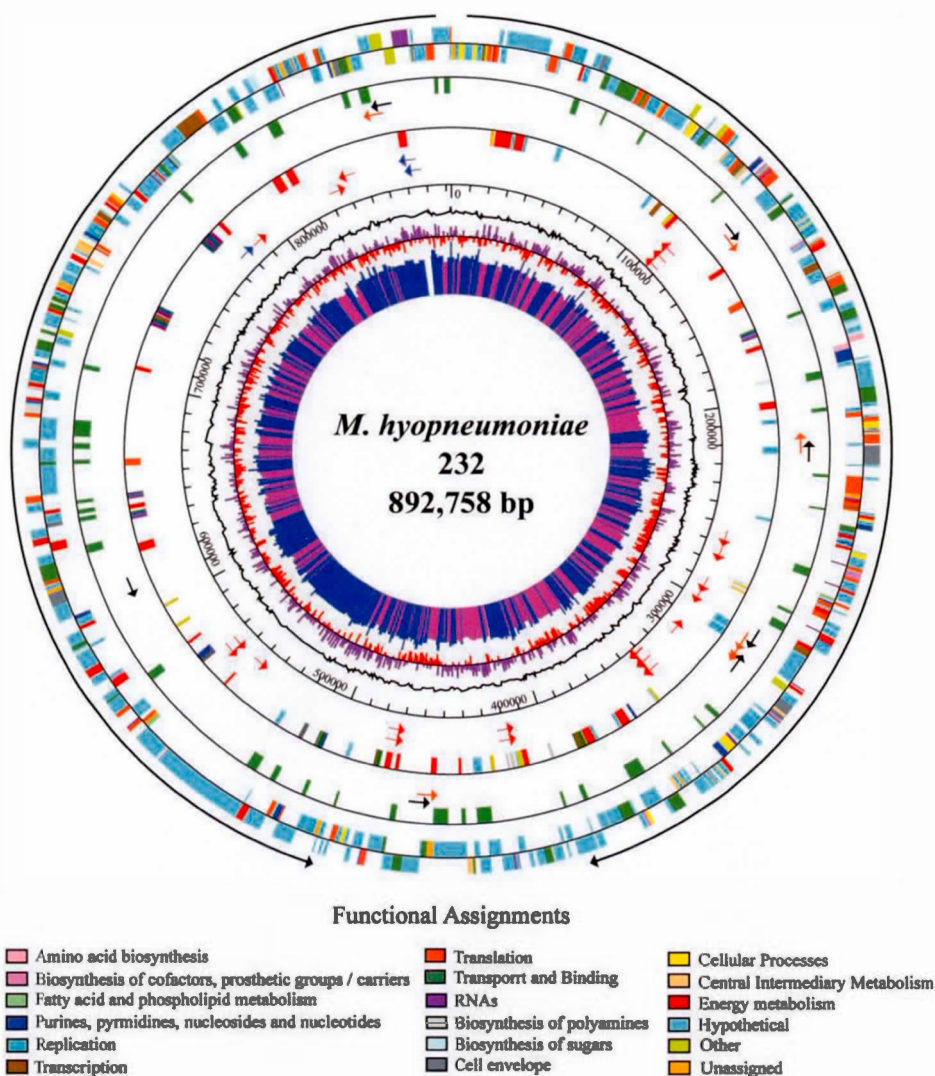
##### 1.1.1 Généralités et impact économique

*M. hyopneumoniae* est l'une des plus petites bactéries retrouvée dans la nature. Elle se caractérise par un génome très petit (580 à 1350 kb) et est dépourvue de paroi cellulaire (Thacker, 2004). Elle contient un ADN double brin et affiche une faible proportion de G /C (28,56 % pour *M. hyopneumoniae* souche 232) (Minion et al., 2004) et utilise le codon UGA (codon stop chez les autres organismes) pour coder le résidu tryptophane (Hsu et al., 1997; Sirand-Pugnet et al., 2007). Elle est la plus importante espèce qui a été identifiée dans le système respiratoire des porcs et est l'agent étiologique primaire de la pneumonie chronique chez le porc (Maes et al., 1996). La pneumonie enzootique du porc (PEP) se produit lorsqu'il y a une infection simultanée avec le *M. hyopneumoniae* et d'autres bactéries opportunistes comme *Pasteurella multocida* ou *Bordetella bronchiseptica* (Thacker, 2004). L'infection par *M. hyopneumoniae* est présente dans les troupeaux de porcs et est répandue dans le monde entier (Maes et al., 1996). Cet agent cause une perte économique importante dans l'élevage des porcs due au coût des traitements et à un retard de croissance des porcs (Maes et al., 2008). Les pertes estimées à l'industrie porcine sont de plus de 200 millions de dollars par année (Hsu and Minion, 1998).

##### 1.1.2 Organisme

Les *Mycoplasma* sont des organismes procaryotes qui diffèrent des virus parce qu'ils possèdent de l'ADN et de l'ARN. De plus, ils sont capables de se développer dans des milieux de culture. Par contre, *M. hyopneumoniae* est difficile à cultiver en laboratoire puisqu'il a besoin d'un milieu nutritionnel très complexe. Etant donné que les *Mycoplasma* n'ont pas de paroi cellulaire, ils sont alors polymorphes. Leur diamètre varie entre 0.2 et 0.5  $\mu\text{m}$ . Ils sont sensibles à plusieurs facteurs environnementaux comme la pression osmotique, les détergents et sont résistants aux antibiotiques qui interfèrent dans la synthèse de la paroi cellulaire (Fig. 1) (Maes et al., 1996). Le génome de la souche *M. hyopneumoniae* 232 a été séquencé (Minion et al., 2004) et il a été démontré qu'il code pour 691 protéines, ce qui représente environ 92% du génome total (Minion et al., 2004; Pendarvis et al., 2014; Siqueira et al., 2014).





**Figure 1. Organisation génomique de *M. hyopneumoniae* 232**

Les flèches extérieures représentent les sens de réplication. En allant de l'extérieur vers l'intérieur, le cercle 1 représente les séquences potentiellement codantes situées sur le brin positif. Le cercle 2 représente les séquences codantes situées sur le brin négatif. Le cercle 3 montre les séquences codantes pour les lipoprotéines. Les petites flèches situées au niveau du cercle 4 représentent la position et la direction des séquences codantes pour la P97 ou ses paralogues (noir) et pour la P102 et ses paralogues (orange). Le cercle 5 montre la position des familles de paralogues contenant au moins 3 membres. Les flèches du cercle 6 indiquent la position des

séquences codantes pour les ARNr (bleu) et les ARNt (rouge). Source (Minion et al., 2004).

### 1.1.3 Mode de transmission

L'infection par *M. hyopneumoniae* survient chez les porcs et les sangliers de tout âge (Sibila et al., 2009b). La transmission du pathogène se fait par contact direct entre les animaux ou par les aérosols (Maes et al., 1996; Marois et al., 2007; Sibila et al., 2009a). Des études ont démontré que la transmission de *M. hyopneumoniae* par les aérosols peut se faire dans un diamètre de 4.7 km (Dee et al., 2009). D'autres études montrent que la transmission peut se faire dans un diamètre de 9.2 km (Desrosiers, 2011; Otake et al., 2010).

### 1.1.4 Symptômes et pathogénécité

*M. hyopneumoniae* adhère aux cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire porcin et endommage l'épithélium (Seymour et al., 2010; Siqueira et al., 2014). Cette adhérence provoque la réduction de l'activité ciliaire, la ciliostase ainsi que la perte de cils, prédisposant les porcs aux infections secondaires (DeBey and Ross, 1994). La PEP est une maladie respiratoire contagieuse chronique à faible mortalité mais avec une morbidité élevée (Maes et al., 1996). Elle est caractérisée par une toux chronique et sèche, un retard de croissance, une hyperthermie, une anorexie et une dyspnée (Kobisch and Marois, 2008). La sévérité des symptômes dépend de la présence des infections secondaires, des conditions environnementales et de la virulence de la souche de mycoplasmes (Maes et al., 1996). Les symptômes peuvent apparaître entre l'âge de 12 à 20 semaines et peuvent persister pendant 8 à 12 semaines puis disparaissent progressivement (Kobisch and Marois, 2008; Maes et al., 1996). Des lésions pulmonaires microscopiques peuvent aussi apparaître (Marois et al., 2008; Vicca et al., 2003). Elles se caractérisent par une infiltration des cellules



inflammatoires dans les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins (Vicca et al., 2003).

#### 1.1.5 Traitement

Le contrôle de l'infection par *M. hyopneumoniae* est une priorité internationale. La lutte contre cette infection peut être accomplie par différentes façons, à savoir : une optimisation des pratiques de gestion et les conditions de logement, l'utilisation des antibiotiques et la vaccination (Maes et al., 2008). Les vaccins à base de bactéries tuées ou atténuées disponibles commercialement sont largement utilisés et sont efficaces dans la réduction des signes cliniques, des infections respiratoires bactériennes secondaires et des lésions pulmonaires (Thacker, 2004). Ces vaccins n'empêchent pas la colonisation du tractus respiratoire par *M. hyopneumoniae* et sa transmission (Villarreal et al., 2011), mais permettent d'améliorer le gain de poids quotidien des animaux, ce qui raccourcit le temps nécessaire pour atteindre le poids d'abattage (Chae, 2011; Maes et al., 1999). Cependant, les vaccins capables d'induire la production des IgA et entraînant ainsi le blocage de la colonisation, paraissent être plus efficaces (Chae, 2011). Des études ont montré qu'une sécrétion d'IgA spécifiques à *M. hyopneumoniae* à la surface de la muqueuse respiratoire peut former une couche protectrice afin d'éliminer les pathogènes envahisseurs et prévenir une infection et une colonisation. Ceci suggère que l'immunité mucosale joue un rôle dans la protection contre l'infection par *M. hyopneumoniae* (Hua et al., 2014).

#### 1.1.6 Protéines d'adhésion

Après son inhalation, *M. hyopneumoniae* adhère aux composants glycosylés et aux composants de la matrice extracellulaire pour coloniser son hôte (Bogema et al., 2012). Plusieurs protéines d'adhésion ont été identifiées jusqu'à présent.

### 1.1.6.1 La protéine P97

Parmi les protéines identifiées chez *M. hyopneumoniae*, la P97 (ou Mhp 183) est une protéine de surface de 97 kDa (Zhang et al., 1995). Le gène codant pour la P97 code pour un précurseur de 126 kDa. Le clivage de l'acide aminé en position 195 génère une protéine d'adhésion fonctionnelle (P97) et une portion N-terminale (P22) (Hsu et al., 1997; Jenkins et al., 2006). La P97 est à son tour clivée pour donner une autre série de peptides. On distingue la portion C-terminale de la P97 contenant la région R2 (P28) et la P97 excluant la P28 en région C-terminale (P70) (Djordjevic et al., 2004).

La P97 joue un rôle majeur dans la fixation de pathogène aux cellules épithéliales porcines (Hsu et al., 1997). Une étude a montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre la P97 inhibent l'adhésion de *M. hyopneumoniae* aux cellules ciliées porcines *in vitro*, ce qui permet d'identifier la P97 comme étant une molécule d'adhésion ciliaire (Zhang et al., 1995).

La P97 est constituée de deux régions contenant des motifs répétés dans sa partie C-terminale, les régions R1 et R2. Dans diverses souches de *M. hyopneumoniae*, la région R1 de la P97 possède un nombre variable de motifs répétés (AAKPV/E) allant de 8 dans la souche C1735/2 à 15 dans la souche 232 (Fig. 2) (Djordjevic et al., 2004; Jang and Kim, 2007). La variation dans le nombre de répétitions d'acides aminés au niveau de la région R1 a été corrélée à la capacité d'adhérence des bactéries (Pinto et al., 2009). Le site de liaison aux cils est situé dans la séquence de répétition AAKPV/E de la région R1 de P97 (Fig. 2) (Hsu and Minion, 1998; Jang and Kim, 2007). Il a été démontré que 8 répétitions contenues dans la région R1 sont suffisantes pour l'attachement du pathogène (Minion et al., 2000).

Une seconde région de répétitions, R2, située en aval de R1, consiste en 10 acides aminés de séquence GTPNQGKKAE dont le nombre varie de 3 à 5 dans les souches de *M. hyopneumoniae* (Fig. 2) (Hsu et al., 1997; Wilton et al., 1998). La région R2 est impliquée dans l'adhésion de *M. hyopneumoniae* à la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte. Les deux régions R1 et R2 sont nécessaires pour permettre la liaison du pathogène aux glycosaminoglycanes (GAGs) de type héparine de la MEC (Jenkins et al., 2006).

Une étude a démontré que la portion C-terminale incluant les répétitions R1 et R2 de P97 sont immunogéniques (Chen et al., 2001). La capacité immunogénique de la région R1 de P97c a été démontrée chez la souris (Chen et al., 2006).

MKELDNKIKGILPQPPAAKPE/AAKPV/AAKPE/TTKPV/AAKPE/AAKPE/AAKPV/AAKPE/  
AAKPV/AAKPE/AAKPV/AAKPE/AAKPV/AAKPE/AAKPVATNTGFSLTNKPKEDYFPMF  
SYKLEYTDENKLSLKTPEINVFLVLHQSEYEEQEIIKELDKTVLNLQYQFQEVKVTSDQ  
YQKLSHPMMTEGSSNQGKKSE/GTPNQGKKAE/GAPNQGKKAE/GTPNQGKKAE GAPSQ  
QSPTTELNYLPDLGKKIDEIHKQGNWKTEVELIEDNIAGDAKLLYFILRDDSKSGDPK  
KSSLKVKITVKQSNNNQEPESK

**Figure 2. Portion C-terminale des motifs répétés de la protéine P97 (P97c) des régions R1 et R2**

La séquence en jaune représente le motif R1 (AAKPE/V répété 15 fois) et celle en vert le motif R2 (GSSNQGKKSE répété 4 fois) de *M. hyopneumoniae*, souche 232. Les barres obliques (/) démarquent les répétitions.

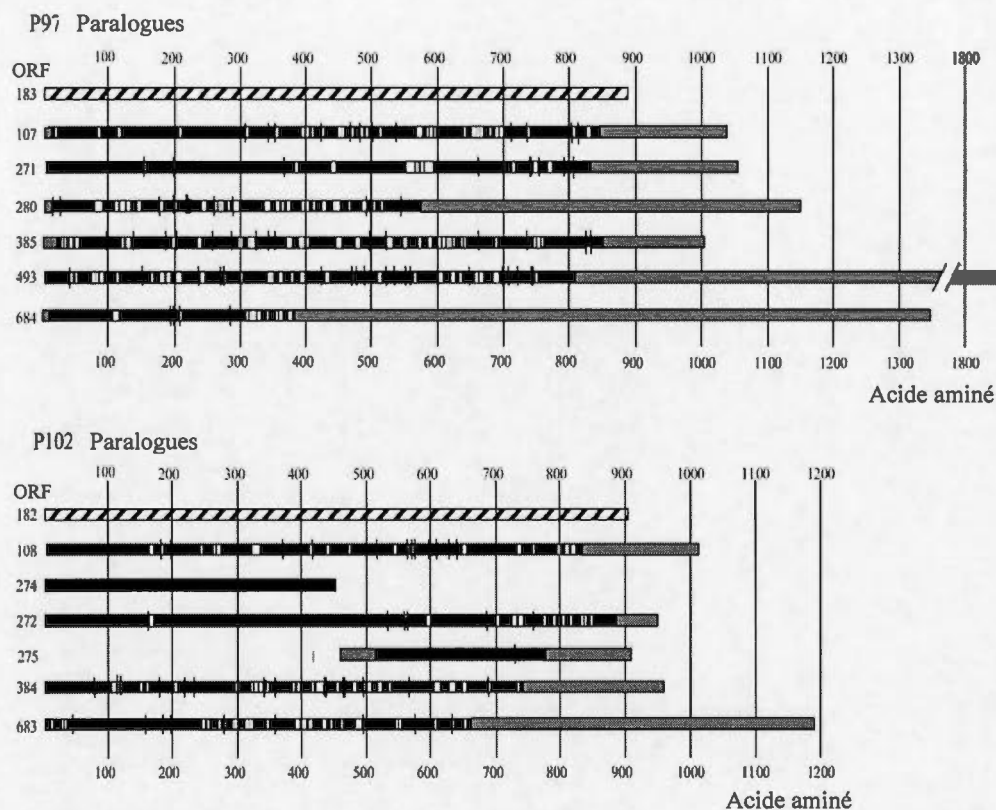
La P97 a 6 paralogues de protéines de *M. hyopneumoniae* avec un degré d'homologie en acides aminés supérieur à 30 % (Mhp 107, 271, 280, 385, 493 et 684) (Fig. 3) (Minion et al., 2004). Le paralogue Mph 271 est le seul à contenir deux régions R1 et une région R2 qui se lient à l'héparine sulfate et à la fibronectine de la

MEC de l'hôte (Deutscher et al., 2010). De même, le Mhp 107 se lie à l'héparine, la fibronectine et au plasminogène *in vitro* (Seymour et al., 2011).

Un autre paralogue de la P97, la protéine P102 (ou Mhp 182) de *M. hyopneumoniae* (Fig. 3), de 102 kDa, est exprimée *in vivo* pendant l'infection à partir du même opéron mais avec un cadre de lecture (ORF) différent (Adams et al., 2005). La P102 est clivée en P60 et P42. Les trois protéines P102, P60 et P42 se lient au plasminogène et les deux protéines P102 et P42 se lient au fibronectine (Seymour et al., 2012). La P102 a aussi 6 paralogues (Adams et al., 2005). Tous ces paralogues sont des protéines de surface (Bogema et al., 2012; Deutscher et al., 2010; Minion et al., 2004; Seymour et al., 2011; Seymour et al., 2012).

La synthèse de ces paralogues est une stratégie que *Mycoplasma* a développé pour varier la topographie de sa surface et ainsi échapper à la détection et l'élimination par le système immunitaire de l'hôte (Browning et al., 2011).





**Figure 3. Analyse des paralogues de la P97 et la P102 chez *M. hyopneumoniae***  
 L'alignement de séquences de protéines paralogues montre des similitudes (noir), des insertions (lignes verticales) et des délétions (blanc) par rapport aux séquences de l'opéron d'adhésine P97 (Mhp 183) ou P102 (Mhp 182). Les zones hachurées indiquent les séquences de P97 et P102. La zone grise n'indique aucune homologie. Les numéros des ORFs sont indiqués sur la gauche; le nombre d'acides aminés sont indiqués. Modifié de : (Minion et al., 2004).

#### 1.1.6.2 Autres protéines d'adhésion de *M. hyopneumoniae*

Une étude a mis en évidence le gène Mhp 494 qui code pour la pré-protéine P159 de 159 kDa (Burnett et al., 2006). Cette protéine se clive pour donner les fragments P27 (27 kDa), P52 (52 kDa) et P110 (110 kDa). La P159 se clive rapidement et largement après la phase de traduction vue qu'elle n'est plus détectable

par immunobuvardage. Un autre précurseur de la P97, la P126, se clive aussi rapidement ce qui suggère que la P159 et la P126 sont clivées via la même voie. Cette étude a montré aussi que la P52, la portion C-terminale de P110 et certains domaines spécifiques de P159 sont capables de se lier à l'héparine.

## 1.2 La réponse immunologique: de l'immunité innée à l'immunité adaptative

Les réponses immunitaires sont classées en immunité innée et immunité adaptative (Akira, 2011). L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux qui nous entourent, et ceci chez tous les organismes pluricellulaires. La réponse immunitaire innée qui arrive très tôt suite à une agression, est une ligne de défense non-spécifique. La première barrière de défense est la barrière peau-muqueuse et la deuxième est la phagocytose et la réponse inflammatoire, qui mettent en jeu les macrophages, les DCs, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cytokines (Villasenor-Cardoso et al., 2013). La réponse immunitaire innée peut-être induite par un signal émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés PRR (pour « *Pattern Recognition Receptors* ») et des molécules du non-soi appelées PAMP (pour « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ») présentes chez les microorganismes (Akira, 2011).

La réponse immunitaire adaptative est la ligne de défense spécifique contre les agents infectieux. Elle est caractérisée par la participation des lymphocytes de l'immunité adaptative. Il existe deux types de lymphocytes : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). L'immunité adaptative est divisée en immunité humorale et cellulaire. L'immunité humorale est impliquée dans l'élimination de microbes présents dans le sang ou les liquides biologiques par la génération d'anticorps qui sont produits par des lymphocytes B. D'autre part, l'immunité cellulaire est responsable de l'élimination des cellules cancéreuses et des microbes à l'intérieur des cellules, et elle est représentée principalement par les cellules T cytotoxiques (Akira, 2011).

L'immunité adaptative fait intervenir les récepteurs des cellules B (BCR) présents sur les LB, et les récepteurs des cellules T (TCR) présent sur les LT ; ces récepteurs vont reconnaître un seul motif antigénique.

Quand un agent pathogène envahit l'hôte, les cellules T et B avec des récepteurs correspondants sont activées, et le développement des lymphocytes T auxiliaires et la production d'anticorps sont induits. En même temps, des cellules T et B mémoires sont générées, ce qui permet à l'hôte de réagir plus rapidement lorsqu'il est réexposé au même agent pathogène (Akira, 2011).

Les DCs font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles jouent un rôle important dans l'activation de l'immunité adaptative, bien que cette activation soit également possible par les autres cellules présentatrices d'antigènes. En effet, ces cellules possèdent une forte capacité de migration. Elles sont donc recrutées au niveau des sites inflammatoires par des cytokines produites par les macrophages et les cellules résidentes, où elles phagocytent l'agent pathogène. Elles vont ensuite quitter le site d'infection et entamer leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Akira, 2011). Les infections virales et d'autres produits microbiens activent les DCs pour produire des cytokines, telles que l'interleukine-12 (IL-12) et l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (Dalod et al., 2002; e Sousa et al., 1997). Les DCs exposées à des cytokines inflammatoires activent d'autres cellules protectrices innées telles que les NK (Fernandez et al., 1999). Les DCs matures initient la réponse de cellules T (Inaba et al., 1993; Inaba et al., 1990), y compris une immunité protectrice contre les infections et les tumeurs (Ludewig et al., 1998; Mayordomo et al., 1995). En outre, les DCs sont capables de polariser la réponse immunitaire aux types Th1 ou Th2 (Maldonado-López et al., 1999; Schuler-Thurner et al., 2002; Soumelis et al., 2002) et d'améliorer la mémoire des cellules T (Dhodapkar et al., 2000). Ces fonctions qui contrôlent l'immunité innée et adaptative exigent que les DCs subissent une maturation. La maturation est induite par de nombreux agents y compris

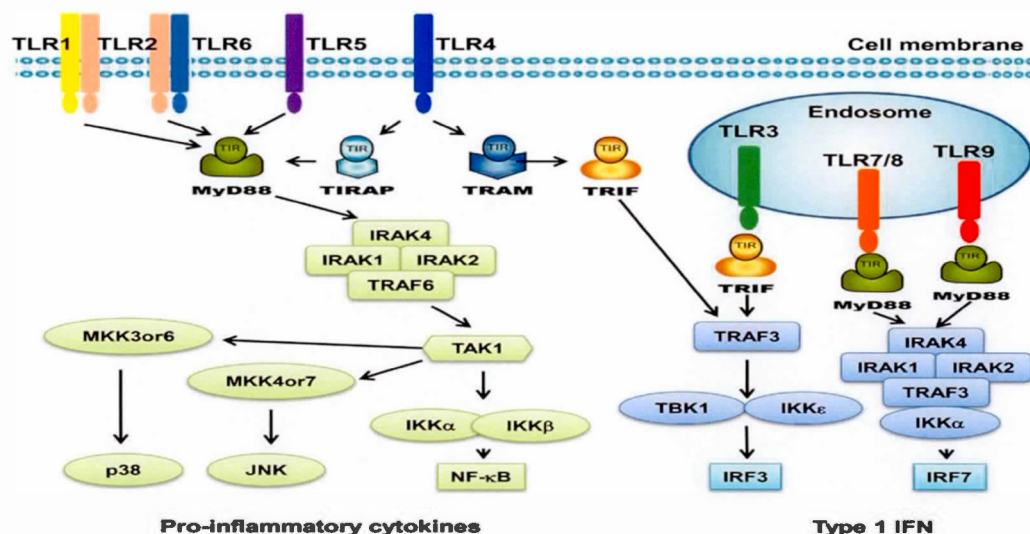


l'infection microbienne (Steinman et al., 2003). L'activation des DCs est mobilisée, entre autre, par les récepteurs Toll-Like (TLRs) (Akira, 2011).

### 1.3 Les récepteurs Toll-Like (TLRs) et leurs ligands

Le système immunitaire reconnaît les PAMP au moyen des récepteurs PRR, qui comprennent les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs *Nucleotide oligomerization domain* (NOD)-like (NLRs), et les récepteurs *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-like (RLRs) (Duthie et al., 2011). Les TLRs jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire innée. On les trouve sur presque toutes les cellules, mais principalement sur les macrophages et les DCs. Ils ont été les premiers PRRs à être identifiés, sont très bien caractérisés et reconnaissent un large éventail de PAMPs (Kawai and Akira, 2011). À ce jour, 12 membres de la famille TLR ont été identifiés chez les mammifères (Akira, 2011). Certains TLRs se trouvent sur la membrane cytoplasmique (TLRs 1, 2, 4, 5 et 6) et d'autres se trouvent sur des vésicules endosomales (TLRs 3, 7, 8, 9 et probablement 13) (Fig. 4) (Beutler, 2009). Les TLRs sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire répété riche en leucine et des régions intra-cytoplasmiques appelées *Toll/Interleukine-1 receptor* (TIR). TIR est un domaine crucial pour la signalisation des TLRs (Beutler, 2009; Kaisho and Akira, 2002).





**Figure 4. Les récepteurs Toll-like et leurs voies de signalisation**

Les TLR 1 et TLR 6 reconnaissent leurs ligands en formant des hétérodimères avec TLR 2. Pour TLR 4, les adaptateurs MD2 et CD14 sont obligatoires pour la reconnaissance et la signalisation par le LPS. Les TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7 et TLR 9 forment des homodimères après interaction avec leurs ligands pour délivrer leur signal. Les TLR 3, TLR 7/8, et TLR 9 sont intracellulaires et sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques. La plupart des TLRs, à l'exception de TLR 3, signalent par la voie de MyD88 pour activer NF- $\kappa$ B et AP-1. TLR 3 et TLR 4 peuvent signaler par une voie de MyD-88 indépendante (voie de TRIF) pour activer IFN- $\beta$ . Source : (Zhao et al., 2014).

### 1.3.1 TLRs 1, 2, 6 et 10

Les TLRs 1, 6 et 10 appartiennent à la sous-famille de TLR 2 (Takeda et al., 2003). Le TLR 2 est exprimé principalement sur les DCs, les macrophages et les lymphocytes (Steinhagen et al., 2011). Le TLR 2 a été démontré comme étant essentiel à la reconnaissance des peptidoglycanes (PGN) des bactéries à Gram positif ainsi que les lipoprotéines et les acides lipotéchoïques (Takeuchi et al., 1999). Le *Mycoplasma* utilise le TLR 2 via son lipopeptide *macrophage-activating lipopeptide-2* (MALP-2) de 2 kDa pour la transduction du signal (Takeuchi et al., 2000). Le TLR

2 est capable de reconnaître une variété de PAMPs par son hétéro-dimérisation avec d'autres TLRs. Le complexe TLR 2/TLR 6 reconnaît les lipoprotéines diacylées (Tableau 1) (Liu et al., 2007). Une inhibition du complexe TLR 2/TLR 6 induit une inhibition de *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) normalement induit par les PGNs. Une activation de TLR 2/TLR 6 induit une activation de *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) (Tableau 1) et la production de cytokines, mais l'activation de TLR 2 seul n'a pas cet effet (Ozinsky et al., 2000). Le TLR 2 forme aussi un hétérodimère avec TLR 1 et ils sont impliqués dans la reconnaissance des lipopeptides triacylés comme le lipopeptide bactérien (BLP) (Akira, 2011; Liu et al., 2007). Le signal de TLR 2/TLR 1 et TLR 2/TLR 6 est conduit par une interaction directe avec l'adaptateur *myeloid differentiation factor-88* (MyD-88) à travers *TIR domain-containing adaptor protein / MyD-88 adaptor like* (TIRAP/Mal) induisant une activation de NF- $\kappa$ B. Cette voie de signalisation est aussi appelée MyD-88 dépendante (Tableau 1) (Liu et al., 2007).

Peu d'informations sont trouvées pour TLR 10 (Chen et al., 2007). Il est le seul membre orphelin parmi les TLRs humains (Hasan et al., 2005). Le TLR 10 est exprimé sur les cellules B et les cellules dendritiques plasmocytoides (Akira, 2003; Bourke et al., 2003). Le signal de TLR 10 est médié par une interaction directe avec MyD-88, et une délétion au niveau du domaine TIR du TLR 10 altère son potentiel de signalisation (Amjadi et al., 2014; Hasan et al., 2005).

### 1.3.2 TLR 4

Les lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines sont probablement les plus puissants agents stimulateurs de la réponse immunitaire innée (Beutler, 2000). Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et est le ligand de TLR 4 (Goldman, 2007; Schletter et al., 1995). Le TLR 4 est présent sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) comme les macrophages et les DCs et se

trouve aussi sur les fibroblastes et les cellules épithéliales (Gribar et al., 2008; Samuelsson et al., 2004; Shanmugam et al., 2012).

La voie de signalisation du TLR 4 est divisée en deux : MyD-88 dépendante et MyD-88 indépendante (Lu et al., 2008). Dans la voie MyD-88 dépendante, TLR 4 se complexe avec une petite glycoprotéine extracellulaire *myeloid differentiation factor 2* (MD-2). Le complexe TLR 4/MD-2 active une cascade de signalisation par l'intermédiaire du domaine cytoplasmique de TIR, permettant une activation ultérieure de *IL-1R associated kinase* (IRAK) et *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6). Ceci conduit à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) ainsi qu'à l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  (Wang et al., 2010; Wang et al., 2014). Le TLR 4 peut également induire l'expression d'interféron de type 1 par l'intermédiaire de *TIR containing adapter protein* (TRIF). C'est la voie MyD-88 indépendante qui nécessite l'adaptateur CD14 pour la signalisation du LPS (Jiang et al., 2005; Takeda and Akira, 2004). Le TRIF induit l'activation de NF- $\kappa$ B et MAPK ainsi que le facteur de transcription *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) par l'intermédiaire de TRAF3 pour induire la production d'INF de type 1 (Lu et al., 2008). Le *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) est un autre TIR et induit l'activation d'IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B pour la production d'IFNs (Tableau 1) (Fitzgerald et al., 2003).

Le *monophosphoryl lipid A* (MPL) est un dérivé non toxique de LPS qui affiche des propriétés adjuvante et immunostimulante. Le MPL a été développé pour être utilisé dans les vaccins, mais il a été démontré que sa capacité à induire le TNF, IL-1, IL-6, IL-12 et IFN- $\gamma$  *in vitro* et *in vivo* est réduite par rapport à celle du LPS (Salkowski et al., 1997).



### 1.3.3 TLR 5

Le TLR 5 se trouve sur plusieurs cellules immunitaires, y compris les DCs, les cellules NKs, les cellules T, les monocytes et les cellules de Langerhans (Caron et al., 2005; Chalifour et al., 2004; Farina et al., 2004; Means et al., 2003; Peiser et al., 2004). La flagelline des bactéries à Gram positif et à Gram négatif se lie d'une façon spécifique au TLR 5 (Mizel et al., 2003). La liaison de la flagelline au TLR 5 induit l'activation de NF- $\kappa$ B et stimule la production de TNF- $\alpha$  via l'adaptateur MyD-88 (Tableau 1) (Hayashi et al., 2001). La flagelline est aussi utilisée comme adjuvant en la fusionnant avec des antigènes recombinants (Steinhagen et al., 2011). Lorsqu'utilisée comme adjuvant, elle stimule les monocytes à produire de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  (Farina et al., 2004), les cellules NKs à produire de l'IFN- $\gamma$  et de l' $\alpha$ -défensine, et les cellules T à proliférer et produire des cytokines et chimiokines comme IL-10, IL-8 et IFN- $\gamma$  (Caron et al., 2005).

### 1.3.4 TLR 3

Le TLR 3 est exprimé principalement dans l'endosome des DCs, des macrophages et des cellules épithéliales (Akira et al., 2006). Le TLR 3 reconnaît les ARNs double brin (dsARN) d'origine virale (Schmausser et al., 2004). Il reconnaît aussi l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C), un analogue synthétique de dsARN et de l'ARNm (Kariko et al., 2004; Matsumoto and Seya, 2008). La signalisation de TLR 3 se fait via TRIF et est MyD-88 indépendante (Schmitz et al., 2004). L'induction de TLR 3 induit l'activation de l'adaptateur TRIF ou *TIR-containing adaptor molecule 1* (TICAM-1) (Oshiumi et al., 2003). Cette activation permet l'induction d'IRF3, du NF- $\kappa$ B et de la protéine activatrice de facteur de transcription (AP-1) conduisant à la production d'IFNs de type 1 et d'IL-8 (Tableau 1) (Alexopoulou et al., 2001; Kariko et al., 2004; Yamamoto et al., 2003). Pour améliorer l'activité et la sécurité des ligands de TLR 3, des produits dérivés du poly



I:C, le poly ICLC et le poly I:C<sub>12</sub>U ont été développés pour être utilisés comme adjuvants (Steinhagen et al., 2011).

### 1.3.5 TLR 7/8

Le TLR 7/8 est exprimé par les DCs, les macrophages, les cellules NK, les monocytes, les lymphocytes et les cellules de Langerhans (Gorden et al., 2005; Hornung et al., 2002; Zarembek and Godowski, 2002). Le TLR 7/8 reconnaît l'ARN simple brin (ssARN) et plus spécifiquement les régions riches en GU (Heil et al., 2004). Les ligands de TLR 7/8 sont classés en composants synthétiques et nucléosides naturels. La reconnaissance de ces nucléosides par TLR 7/8 induit l'activation d'une voie intracellulaire résultant en l'induction des cytokines telles que IL-10, de chimiokines, des IFNs de type 1 et de molécules co-stimulatrices. Pour ce faire, le domaine TIR/MyD-88 est activé et recrute la molécule IRAK, ce qui induit une activation en cascade de MAPKs et I $\kappa$ B kinase (IKK). Des membres de la famille MAPK phosphorylent et activent AP-1 alors que le complexe IKK est impliqué dans la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. AP-1 et NF- $\kappa$ B contrôlent l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. De plus, des facteurs de transcription de la famille des IRFs sont activés via la voie MyD-88 dépendante résultant en l'induction d'INF de type 1 (Tableau 1) (Kawai and Akira, 2007; Smits et al., 2008).

### 1.3.6 TLR 9

Le TLR 9 est exprimé sur les cellules B humaines et les cellules dendritiques plasmocytaires (pDC) (Bourke et al., 2003). Il reconnaît les motifs C-phosphate-G (CpGs) non-méthylés présents en grande fréquence dans l'ADN bactérien, selon des motifs spécifiques de l'espèce, GTCGTT pour le CpG humain et GACGTT pour le CpG murin (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Le TLR 9 peut aussi être stimulé

par un oligodeoxynucléotide synthétique contenant un motif ou plus de CpGs non-méthylés (CpG ODN) (Krieg, 2007). Les CpGs activent la voie de signalisation TIR via MyD-88 et TRAF6 et indépendamment de CD14 et MD-2, résultant en l'activation de I $\kappa$ B et *c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase* (JNK) (Tableau 1) (Hacker et al., 2000; Wagner, 2002). L'activation de JNK 1/2 et p38 induit l'activation de AP-1 (Wagner, 2002). Cela induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-12) et joue un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire de type Th1 et la prolifération des cellules B (Halpern et al., 1996; Klinman et al., 1996; Kumagai et al., 2008; Takeshita et al., 2001).

### 1.3.7 TLR 11

Le TLR 11 est présent sur les DCs des souris au niveau endosomal (Yarovinsky et al., 2005). Chez l'homme, le gène codant pour le TLR 11 est coupé par un codon stop, de sorte que le TLR 11 n'est pas exprimé (Zhang et al., 2004). Le ligand de TLR 11 est la profiline, une molécule produite par le *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) qui est un protozoaire parasite (Yarovinsky et al., 2005). Cette profiline montre une homologie significative avec des gènes codant la profiline pour d'autres parasites comme le *Plasmodium*, ce qui suggère que le TLR 11 est impliqué dans la reconnaissance des infections parasitaires (Lauw et al., 2005). L'activation de TLR 11 par le ligand induit l'activation du domaine TIR/CD4 via la voie MyD-88, ce qui résulte en l'activation de NF- $\kappa$ B et AP-1 et la production d'IL-12, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  (Tableau 1) (Scanga et al., 2002; Zhang et al., 2004).

### 1.3.8 TLR 13

Le TLR 13 est un TLR endosomal qui est exprimé dans les cellules murines comme les cellules macrophagiques RAW 264.7, les fibroblastes embryonnaires, et les fibroblastes NIH 3T3 (Shi et al., 2009). L'activation de TLR 13 par l'ARN

bactérien via la voie MyD-88 et *Unc-93 homolog B* (UNC93B), induit l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression de cytokines telles qu'IL-12 et IL-6 (Tableau 1) (Hidmark et al., 2012). Il a aussi été démontré que TLR 13 reconnaît l'ARN ribosomal 23S (ARNr 23S) et induit la production d'IL-1 $\beta$  par la voie MyD-88 et UNC93B-1- dépendante (Tableau 1) (Li and Chen, 2012).

**Tableau 1. Les TLRs, leurs ligands et leurs voies de signalisation**

TLRs	Localisation	Ligands	Voies de signalisation	Facteurs de transcription
TLR 2/TLR 1	Membrane plasmique	Lipopeptides diacylés	MyD-88, Mal	NF- $\kappa$ B
TLR 2/TLR 6	Membrane plasmique	Lipopeptides triacylés	MyD-88, Mal	NF- $\kappa$ B
TLR 3	Endosome	dsARN, Poly (I:C)	TRIF	IRFs, NF- $\kappa$ B
TLR 4	Membrane plasmique	LPS, MPL	MyD-88, Mal TRIFs, TRAM	IRFs, NF- $\kappa$ B
TLR 5	Membrane plasmique	Flagelline	MyD-88	NF- $\kappa$ B
TLR 7/8	Endosome	ssARN riche en GU	MyD-88	IRFs, NF- $\kappa$ B
TLR 9	Endosome	CpG non-méthylés	MyD-88, TRAF6	IRFs, NF- $\kappa$ B
TLR 10	Membrane plasmique	Inconnu	MyD-88	Inconnu
TLR 11	Endosome	Profiline	MyD-88	NF- $\kappa$ B
TLR 13	Endosome	ARN bactérien	MyD-88, UNC93B	NF- $\kappa$ B

**Légende.**

MyD-88: *Myeloid differentiation factor-88*; Mal: *MyD-88 adaptor like*; NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor  $\kappa$ B*; TRIF: *TIR containing adaptor protein*; IRF: *Interferon regulatory factor*; LPS: lipopolysaccharide; MPL: *Monophosphoryl lipid A*; Poly (I:C): Acide



poluinositique-polycytidilique; TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*; TRAF: *TNFreceptor-associated factor*; UNC93B: *Unc-93 homolog B*.

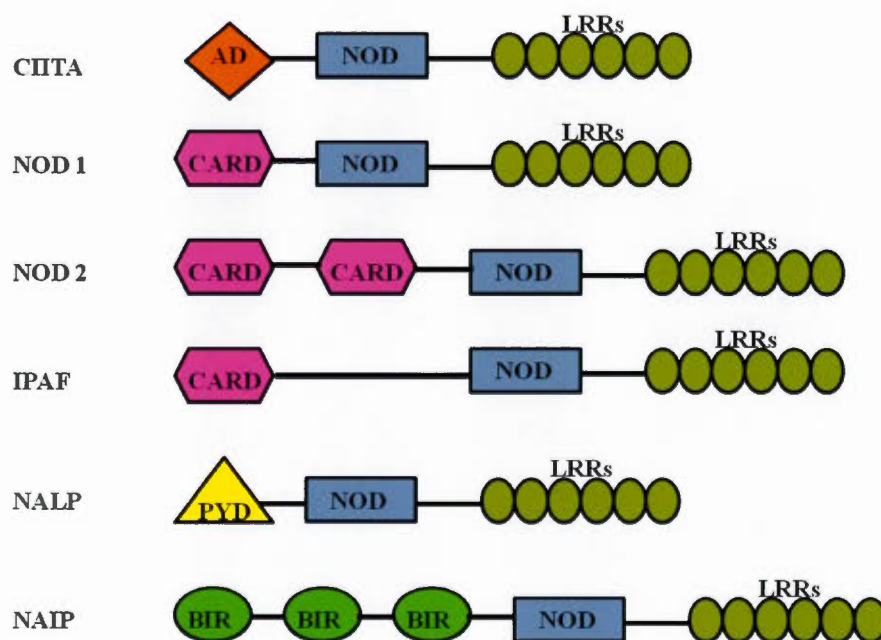
#### 1.4 Les récepteurs NOD-like (NLRs)

Les NLRs sont un groupe spécialisé de protéines intracellulaires qui jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Il existe 23 membres de la famille NLR chez l'homme et au moins 34 gènes codant les NLRs chez la souris. Les NLRs sont exprimés dans de nombreux types de cellules incluant les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. Certains membres de la famille des NLRs sont exprimés principalement dans les phagocytes, y compris les macrophages et les neutrophiles (Franchi et al., 2009). Les NLRs sont des protéines multimériques composées d'une région effectrice variable en N-terminal. Cette région est constituée d'un domaine de recrutement de caspases (CARD), d'un domaine pyrine (PYD), d'un domaine acide (DA), ou des répétitions d'inhibiteur de baculovirus (BIR), d'un NOD (le domaine NOD est reconnu aussi par cassette NACHT), et de répétitions en C-terminal riches en leucine (LRRs) qui détectent les PAMPs (Franchi et al., 2006). La famille de NLRs contient le *NACHT*-, *LRR*-, *PYD-containing domain* (NALP), le NOD, le *major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator* (CIITA), l'*ICE-protease activating factor* (IPAF) et le *neuronal apoptosis inhibitor protein* (NAIP). Ces récepteurs détectent principalement des pathogènes intracellulaires (Fig. 5) (Balamayooran et al., 2010). Les NODs les plus caractérisés sont NOD1 et NOD2. Le NOD1 a un seul domaine CARD et NOD2 a deux domaines CARD dans leur partie N-terminale (Franchi et al., 2009). Ces deux NODs détectent des monomères de mucopeptides provenant de PGNs bactériens (Magalhaes et al., 2005). Le NOD1 détecte le PGN de type acide diaminopimélique (DAP) et le NOD2 détecte le motif commun aux PGNs appelé le muramyl dipeptide (MDP) (Tableau 2) (Girardin et al., 2003a; Girardin et al., 2003b). La stimulation de NOD1 ou NOD2 induit l'activation de NF- $\kappa$ B et MAPK ce qui entraîne la



transcription de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, résultant ainsi en la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires telles que CXCL1, CCL2, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Hayden and Ghosh, 2004; Park et al., 2007a; Park et al., 2007b).

Outre NODs, il y a d'autre NLRs qui jouent un rôle important dans la défense antimicrobienne de l'hôte. La sous-famille NALP a un domaine pyrine au lieu de CARD dans l'extrémité N-terminale et est composée de 14 membres. NALP1, NALP2 et NALP3 forment un complexe multiprotéique appelé «inflammasome» comprenant l'*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) et de la caspase. Ce complexe active la caspase 1 et entraîne le clivage de la pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 et pro-IL-33 à leurs formes biologiquement actives (Tableau 2) (Balamayooran et al., 2010).



### Figure 5. Structure des membres de la famille des NLRs

La portion N-terminale est différente pour chaque membre de la famille des NLRs. Elle peut être constituée en un domaine acide (AD), un ou plusieurs domaines de recrutement de caspase (CARD), un domaine pyrine (PYD) et trois domaine inhibiteurs de baculovirus (BIR). La portion centrale et la portion C-terminale sont constantes et sont constituées d'un *Nucleotide oligomerization domain* (NOD) et de répétitions riches en leucines (LRRs) respectivement. Légende : CIITA : *MCH class II transcription activator* ; IPAF : *ICE-protease activating factor* ; NALP: *NACHT-, LR-R, PYD-containing domain* ; NAIP: *Neuronal apoptosis inhibitor protein*.

**Tableau 2. Les NLRs, leurs ligands et leurs voies de signalisation**

NLRs	Ligands	Voies de signalisation
NOD1	PGNs de bactéries à Gram (-) (DAP)	NF-κB MAPK
NOD2	PGNs de bactéries à Gram (-/+) (MDP)	NF-κB MAPK
NALPs (1-14)	MDP, ADN bactérien, ATP, toxines, ARN viral et bactérien, cristaux d'acide urique (Corridoni et al., 2014)	Caspase-1

PGNs: peptidoglycanes ; DAP: Acide diaminopimélique ; MDP: Muramyl dipeptide ; NALP: *NACHT-, LR-R, PYD-containing domain* ; NOD: *Nucleotide oligomerization domain*.

### 1.5 Les vaccins conventionnels et les vaccins sous-unitaires

L'évolution de la résistance aux antibiotiques est un obstacle majeur à la lutte contre les maladies infectieuses. Les méthodes de prévention des maladies comme l'approvisionnement suffisant d'aliments sains et de l'eau potable, les vaccinations, l'amélioration de l'hygiène personnelle, et la réduction de l'utilisation inappropriée des antibiotiques se sont avérées efficaces dans la lutte contre de nombreuses maladies (Binder et al., 1999). En ce qui concerne les vaccins, la vaccination est l'une des méthodes les plus efficaces pour prévenir les maladies infectieuses. Toutefois, leur efficacité dépend de la variabilité et l'évolution permanente des sérotypes, dans une population donnée, de bactéries ou virus pathogènes (Tekle et al., 2012). Les vaccins sous-unitaires modernes qui sont d'une grande pureté par rapport aux vaccins traditionnels, sont souvent incapables d'induire de fortes réponses immunitaires nécessaires pour induire une mémoire immunologique (Mathew et al., 2012). Les vaccins ont pour objectif d'induire une réponse immunitaire très efficace et protectrice pour prévenir les infections mais cette immunité est difficile à obtenir (Emerson and Purcell, 2003). C'est le cas du Bacille Calmette-Guérin (BCG) qui n'empêche pas l'infection de la tuberculose mais qui protège contre les formes septicémiques et méningées de la maladie. Une étude a démontré que l'immunisation de porcs avec des protéines extracellulaires purifiées du *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) induit une protection contre la perte de poids, la mort et la croissance de *M. tuberculosis* dans les poumons et la rate des porcs (Horwitz et al., 1995).

Certains vaccins peuvent être conçus en vue d'une utilisation thérapeutique et non plus prophylactique. C'est le cas de vaccins à l'étude pour le traitement de cancers et de certaines infections virales chroniques (Bêta lymphoma et l'anticorps monoclonal anti CD20). Les vaccins classiques sont utilisés à titre prophylactique pour fournir une protection contre les maladies infectieuses. La plupart des vaccins expérimentaux contre le cancer sont utilisés à des fins thérapeutiques pour induire une réponse immunitaire capable d'éradiquer une maladie déjà existante. En outre, un vaccin contre le cancer peut être utilisé pour traiter la maladie résiduelle et pour



protéger contre les rechutes une fois la tumeur traitée par chirurgie ou chimiothérapie (Buskas et al., 2009).

Les vaccins traditionnels sont basés sur les agents pathogènes morts ou atténués, ce qui peut être potentiellement dangereux ou difficiles à maintenir dans les conditions ambiantes. Une alternative à ces types de vaccins est ceux contenant des composants sous-unitaires. Certains vaccins sous-unitaires qui sont constitués de petits peptides présentés aux lymphocytes T (Kovjazin et al., 2011). Les protéines cibles peuvent être produites par génie génétique : le gène codant pour un antigène doit être connu, cloné, introduit dans une « usine biologique » comme une bactérie, la levure ou une cellule animale, qui va produire alors la molécule dans un milieu de culture approprié. C'est le cas du vaccin de l'hépatite B produit chez les levures (Bitter et al., 1988). Dans le développement de vaccins, un compromis entre la sécurité et l'efficacité est nécessaire, et les adjuvants peuvent être utilisés pour améliorer leur efficacité (Petrovsky and Aguilar, 2004).

## 1.6 Les adjuvants

Un adjuvant est une substance (molécules, composés ou complexes macromoléculaires) qui augmente l'immunogénicité d'un vaccin pour fournir une plus grande efficacité et une plus longue durée de protection (Perez et al., 2012; Petrovsky and Aguilar, 2004). Les adjuvants peuvent être utilisés à diverses fins: (i) améliorer l'immunogénicité des antigènes hautement purifiés ou recombinants; (ii) réduire la quantité d'antigène ou le nombre d'immunisations nécessaires pour l'immunité protectrice; (iii) améliorer l'efficacité des vaccins chez les nouveaux nés, les personnes âgées ou immunodéprimées; ou (iv) en tant que systèmes de délivrance de l'antigène pour l'absorption des antigènes par la muqueuse (Douce et al., 1995; Marx et al., 1993; McElrath, 1995).



Les adjuvants utilisés dans les vaccins ont plusieurs caractéristiques importantes. Un adjuvant doit être sans danger pour les humains ou les animaux, stable avant l'administration, facilement biodégradable, facile à utiliser, peu coûteux à produire et apte à augmenter la réponse immunitaire spécifique de l'antigène (Alving et al., 2012; Edelman, 1980). Les adjuvants sont également considérés comme des systèmes de livraison qui permettent d'augmenter l'immunogénicité d'un vaccin en améliorant l'absorption d'antigènes par les CPAs (Leroux-Roels, 2010; Lindblad, 2004; Mannhalter et al., 1985). Une de nombreuses classifications qui existent a divisé les adjuvants en : (i) sels d'alun et autres adjuvants minéraux ; (ii) agents tensioactifs ; (iii) dérivés bactériens ; (iv) véhicules et matériels de libération lente ou cytokines (Petrovsky and Aguilar, 2004).

#### 1.6.1 Les adjuvants à base de sels minéraux

##### 1.6.1.1 L'hydroxyde d'aluminium

L'hydroxyde d'aluminium, ou alun, absorbe l'antigène et provoque sa libération retardée à partir du site d'injection par une formation de dépôt (Petrovsky and Cooper, 2011). Il est utilisé dans la plupart des vaccins humains actuellement disponibles (Lindblad, 2004), et il est utilisé depuis près de 80 ans (Leroux-Roels, 2010). Les sels d'alun induisent une réponse immunitaire humorale, mais rarement une réponse immunitaire cellulaire, ce qui cause un obstacle important dans le développement de vaccins (Brewer et al., 1996). De plus, les sels d'alun induisent la production d'anticorps de type Th2 principalement (ex. IgE et IgG1) (Brunner et al., 2010). Chez la souris, la commutation de classe d'IgE et d'IgG1 est accompagnée par la sécrétion de cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13. Chez l'homme, les cellules Th2 produisent des cytokines similaires (Mosmann and Sad, 1996). Il a également été démontré que les sels d'aluminium activent des composants du complexe inflammasome, résultant dans le processus et la libération

de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , et IL-18 (Lambrecht et al., 2009). Bien que l'alun soit considéré comme sécuritaire, il existe plusieurs effets secondaires potentiels comme la formation de granulomes, la production excessive d'IgE, l'allergénicité et la neurotoxicité (Audibert and Lise, 1993; Straw et al., 1985; Vogelbruch et al., 2000).

#### 1.6.1.2 Autres sels minéraux adjuvants

Les sels de calcium, de fer et de zircon ont été utilisés pour l'absorption des antigènes (Butler et al., 1969). Le phosphate de calcium a été utilisé dans le vaccin de la *Diphtheria-Tetanus-Pertusis* (DTP) (Gupta and Siber, 1995; Relyveld et al., 1964). Bien que présentant des propriétés similaires à l'alun, le phosphate de calcium a l'avantage qu'il est un composé naturel pour le corps humain et est donc particulièrement bien toléré. Il a une bonne capacité pour adsorber les antigènes et induit des niveaux élevés d'anticorps IgG mais n'augmente pas la production d'IgE (Relyveld, 1986).

#### 1.6.2 Adjuvants tensioactifs

Le Quil A est un mélange de 23 différentes saponines dérivées d'un extrait aqueux de l'écorce de *Quillaja saponaria*. Les fractions purifiées à partir de cet extrait par chromatographie en phase inverse, principalement le *Quillaja saponaria*-21 (QS-21), ont été étudiées comme alternative à l'alun (Kensil et al., 1998). Les saponines sont des glycosides tensioactifs contenant un noyau hydrophobe de structure triterpénoïde avec une chaîne glucidique liée au noyau (Behboudi et al., 1995). Les adjuvants *Immune stimulating complexes* (ISCOMs) qui sont des complexes en forme de cage et constitués de Quil A, de lipides, de cholestérol et de l'antigène induisent un fort effet adjuvant pour les antigènes T-dépendants et T-indépendants (Kensil, 1996; Skene and Sutton, 2006). Ils fonctionnent à travers les interactions hydrophobiques

pour emprisonner les protéines et faciliter leur endocytose par les CPAs. Ils induisent des titres élevés en anticorps et également une forte réponse lymphocytaire T cytotoxique, et potentialisent la réponse pour les antigènes mucosals (Skene and Sutton, 2006; Takahashi et al., 1990). Le Quil A a été utilisé avec succès pour des applications vétérinaires. Par contre, il est généralement considéré comme trop toxique pour usage humain. En plus des réactions locales sévères et des granulomes, une toxicité comprenant une sévère hémolyse reflète l'affinité de saponines au cholestérol présent dans les membranes des érythrocytes, ce qui entraîne une solubilisation de la membrane et l'hémolyse (Kamstrup et al., 2000; Ronnberg et al., 1997; Ronnberg et al., 1995).

#### 1.6.3 Adjuvants de dérivés bactériens

Compte tenu de leur capacité immunostimulante puissante, les dérivés bactériens constituent une source potentielle majeure d'adjuvants. Les PGNs de la paroi cellulaire ou les LPS de bactéries à Gram négatif augmentent la réponse immunitaire contre des antigènes co-administrés malgré leurs faible immunogénicité. Cette activité adjuvante est transmise par l'activation des TLRs qui interviennent dans les signaux activant le système de défense immunitaire de l'hôte (Petrovsky and Aguilar, 2004). Les LPS sont de puissants agents mitogènes des lymphocytes B, et activent les cellules T pour produire d'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et plus d'améliorer les réponses immunitaires cellulaires. L'élément structurel majeur responsable de leur toxicité et de l'effet adjuvant est le lipide A. Dans des conditions faiblement acide, le lipide A peut être hydrolysé pour obtenir le MPL, un composé qui conserve l'activité adjuvante de lipide A avec une toxicité réduite (Nahori et al., 2005).

#### 1.6.4 Émulsions



Des émulsions d'adjuvants eau dans huile (E/H) utilisés précédemment, comme l'adjuvant incomplet/complet de Freund (I/CFA), étaient trop réactogènes pour leur utilisation chez l'homme de sorte que leur utilisation a été interrompue. Ils ont la capacité de provoquer à la fois une réponse Th1 (CFA) et Th2 (IFA). Les mycobactéries présentes dans le CFA induisent aussi une réponse Th17 dans des cultures de cellules murines et *in vivo*. Ceci est accompagné par une élévation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-23 et de *Transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) (McGeachy and Cua, 2008). La purification ultérieure de matériaux de base a donné lieu à de nouvelles versions d'émulsion eau dans huile qui sont acceptables pour une utilisation principalement dans des vaccins thérapeutiques (Leroux-Roels, 2010). Parmi les émulsions eau dans huile qui sont en essais cliniques, on trouve les émulsions de Montanide ISA 51. Il est utilisé en phase clinique immuno-thérapeutique. Malgré qu'il présente une sécurité relativement bonne, le ratio « risque versus bénéfice » reste encore élevé (Aucouturier et al., 2006). En plus d'émulsions E/H, des émulsions huile dans eau (H/E) ont également été développées. Le MF59<sup>®</sup> (Novartis) est constitué de 5% squalène, 0.5% Tween 80 et 0.5% sorbitan trioleate. Le mécanisme d'action de MF59<sup>®</sup> reste encore ambigu (Brunner et al., 2010). Le MF59<sup>®</sup> interagit avec des CPAs au site d'injection, se disperse lentement vers les ganglions lymphatiques drainants, où il est le plus concentré deux jours après l'injection. Dans les ganglions lymphatiques, il subit l'endocytose par des cellules de ganglions lymphatiques résidents qui présentent les caractéristiques des CPAs (Schultze et al., 2008). Ceci peut accroître l'efficacité de la présentation d'antigène (Dupuis et al., 1998). Des essais cliniques avec des vaccins adjuvantés au MF59<sup>®</sup> ont été effectués dans différents groupes d'individus, des nouveau-nés aux personnes âgées. Ces essais ont montré une augmentation de l'immunogénicité des antigènes co-administrés, associée à un niveau élevé de sécurité et la tolérabilité (Schultze et al., 2008). D'une part, chez des souris BALB/c, le MF59<sup>®</sup> a démontré qu'il est capable d'induire des quantités élevées d'IgE et des quantités modérées d'IgG accompagnées par la sécrétion de cytokines de la réponse Th2 comme l'IL-5 et IL-6 (Valensi et al.,



1994). D'autre part, le MF59<sup>®</sup> permet la production de cytokines de la réponse Th1, comme IFN- $\gamma$  et IL-2, chez les macaques rhésus (Verschoor et al., 1999). En général, le MF59<sup>®</sup> induit une réponse Th1 qui favorise la génération efficace de lymphocytes T cytotoxiques, ce qui caractérise donc le MF59<sup>®</sup> par son potentiel à induire une réponse cellulaire et humorale (Radošević et al., 2008). Comparativement à l'alun, le MF59<sup>®</sup> induit une plus grande réponse immunitaire (Vajdy et al., 2006; Wack et al., 2008). Il a été le premier adjuvant à être autorisé pour l'utilisation humaine après l'alun. De plus, il est utilisé comme adjuvant dans les vaccins contre l'influenza pour les personnes âgées et est disponible sur le marché de plusieurs pays dans le monde (Podda and Del Giudice, 2003).

#### 1.6.5 Liposomes, virosomes et nanoparticules

Les liposomes sont des vésicules de taille variable comprenant principalement une couche mince de phospholipides amphipathiques semblable à celle de la membrane cellulaire. Du fait des propriétés chimiques des phospholipides, ils peuvent former une bicouche lipidique sphérique et continue avec un compartiment interne aqueux qui peut être chargé par des antigènes (Kersten and Crommelin, 2003). Les produits licenciés ne contiennent pas des liposomes, mais plutôt des virosomes, qui sont des enveloppes vides reconstituées du virus de la grippe semblable aux liposomes, mais avec l'avantage d'avoir une enveloppe glycoprotéique virale fonctionnelle, qui aide à l'absorption cellulaire et la fusion de la membrane pour présenter les antigènes aux cellules cibles (Felnerova et al., 2004). Les *Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes* (IRIVs) sont un exemple de particules liposomales. En général, le mécanisme d'action des IRIVs est très similaire au virus de la grippe naturelle. La propriété immunogène d'IRIV résulte de la présence de l'antigène biologiquement actif de la grippe, hémagglutinine (HA), dans leur membrane, qui médie une interaction avec des récepteurs d'Ig sur les lymphocytes B (Brunner et al., 2010). Les IRIVs induisent une stimulation des

cellules T CD4+ (voie de CMH II) et T CD8+ (voie de CMH I), et fait une sorte de balancement entre les réponses Th1/Th2 ce qui rend IRIV un adjuvant intéressant (Bungener et al., 2002; Wilschut, 2009). Les virosomes étudiés dans les essais cliniques pour divers vaccins contre l'hépatite A montrent une sécurité comparable à l'alun mais avec une immunogénicité supérieure. Actuellement, les virosomes sont couramment utilisés comme adjuvant dans le vaccin Epaxal® (Berna biotech) contre l'hépatite A (Zurbriggen et al., 2000).

Les nanoparticules sont des polymères biodégradables tels que l'acide polylactide-co-glycolide (PLGA), et ont des propriétés adjuvantes du fait de leur effet de dépôt et leur caractère particulaire (Igartua et al., 1998; Schöll et al., 2005). Il a été démontré qu'elles stimulent l'immunité systémique et mucosale (Igartua et al., 1998). En général, les PLGA induisent une réponse humorale (Román et al., 2008). Dans des études précliniques, les nanoparticules induisent des titres d'anticorps comparables à ceux des sels d'aluminium après l'immunisation systémique (Panyam and Labhasetwar, 2003).

#### 1.6.6 Cytokines en tant qu'adjuvants

Bien qu'à l'état expérimental, les cytokines sont incluses dans la classification moderne des adjuvants (Petrovsky and Aguilar, 2004). L'IFN- $\gamma$  est une cytokine pléiotropique en mesure d'améliorer les réponses immunitaires cellulaires à travers une variété de mécanismes (Xiang and Ertl, 1995). Le *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) améliore la réponse immunitaire en activant et recrutant les CPAs (Heufler et al., 1988). Cependant, l'application pratique de GM-CSF comme adjuvant a été limitée par la nécessité de doses multiples, de même que la toxicité et l'immunogénicité des cytokines hétérologues (Byars and Allison, 1990). Les cytokines sont en particulier considérées comme ayant un potentiel dans les vaccins à ADN, où la cytokine peut être exprimée par le même vecteur que l'antigène

(Egan and Israel, 2002). D'autre part, l'application directe d'IL-12 et autres cytokines solubles s'est révélée efficace comme adjuvant mucosal (Bradney et al., 2002; Lynch et al., 2003).

#### 1.6.7 Polysaccharides en tant qu'adjuvants

L'inuline, un glucide dérivé de racines de plantes de la famille des *Compositae*, est un adjuvant immunitaire puissant lorsqu'elle est en forme de microparticules. Les microparticules d'inuline (MPI) sont des puissantes activateurs de la voie alterne du complément et de ce fait elles activent le système immunitaire inné (Cooper, 1995). Les MPI sont particulièrement efficaces pour stimuler des réponses immunitaires cellulaires sans la toxicité normalement présentée par d'autres adjuvants tels que des CFAs, Montanides ou QS-21. Les MPI peuvent être combinées à d'autres adjuvants pour produire de nouveaux adjuvants avec des degrés d'activation de Th1 et Th2 variables. Par exemple, l'alammulin est une combinaison de MPI et d'hydroxyde d'aluminium. L'alammulin présente un ratio plus élevé d'activité de Th2 versus Th1 que le MPI seul, donnant un effet global équivalent à celui de l'alun en dépit de sa faible teneur globale en alun (Cooper et al., 1991; Cooper and Steele, 1991). Les MPI induisent à la fois des réponses immunitaires Th1 et Th2, mais n'induisent pas d'IgE, et ne sont pas associées à une toxicité locale ou systémique significative (Silva et al., 2004). L'inuline est métabolisée en sucres simples, le fructose et le glucose, dans le corps et, par conséquent, ne présente pas le problème de sécurité des adjuvants à base d'alun (Aguilar and Rodriguez, 2007).

#### 1.6.8 Adjuvants mucosaux

Bien qu'il existe de nombreuses classes d'adjuvants, tous ne sont pas efficaces pour promouvoir des réponses immunitaires mucosales. En fait, l'alun, l'adjuvant le plus couramment utilisé dans les vaccins humains actuels, est un inducteur faible,



voire inefficace, de l'immunité mucoale. Les trois produits bactériens avec le plus grand potentiel d'adjuvant mucoal sont les entérotoxines ADP-ribosylés, *Heat-labile enterotoxin* (Lt) et *Cholera toxin* (Ct), CpG ODN, et le MPL (Lawson et al., 2011). Ces composés favorisent l'induction des anticorps IgA spécifiques aux antigènes et une mémoire de longue durée spécifique aux antigènes co-administrés lorsque ces antigènes sont administrés par voie mucoale ou transcutanée. Le Ct induit les cellules CD4<sup>+</sup> Th2 spécifiques à l'antigène, sécrétant l'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 qui fournissent des signaux d'induction d'IgAs (IgA de surface) spécifiques à l'antigène ainsi que des réponses sériques d'IgG1, IgA et IgE dans des modèles de souris. Il facilite également la commutation des cellules B à IgA et augmente l'effet de l'IL-4 et IL-5 sur la synthèse d'IgG et IgA dans des cultures de cellules B spléniques activées par le LPS. Contrairement à Ct, l'immunisation des souris avec l'antigène et le Lt induit l'activation mixte des cellules CD4<sup>+</sup> Th1/Th2, et l'activation ultérieure des réponses mucoales IgAs et sériques IgG1, IgG2a et IgA (Freytag and Clements, 2005). D'autres études révèlent que Ct favorisent la réponse Th17, et par suite l'expression d'IL-17 qui joue probablement un rôle important dans la protection induite par le vaccin. Des souris vaccinées par voie intra-nasale avec l'antigène et le Ct produisent des cellules Th17 spécifiques de l'antigène avec des niveaux élevés d'IgA et peuvent être protégées contre l'anthrax inhalé. Chez des souris où l'IL-17 a été neutralisé ou chez les souris *knockout* vaccinées, les taux d'IgA sont réduits et les souris succombent au défi de l'anthrax (Datta et al., 2010).

#### 1.6.9 Adjuvants à base d'acides nucléiques

Les motifs CpGs d'ADN bactérien reconnus par le TLR 9 induisent la production d'IFN- $\alpha$ , d'IFN- $\beta$  et d'IL-12 par des cellules du système immunitaire inné, favorisant ainsi une réponse cellulaire de type Th1 (Aguilar and Rodriguez, 2007). Par conséquent, des molécules contenant des CpGs à base d'ADN seraient



utiles pour des applications thérapeutiques et également pour être utilisées comme adjuvant dans des vaccins (Klinman, 2004).

### 1.7 Hypothèses et objectifs

Dans le but de développer des vaccins bivalents, des études précédentes dans notre laboratoire ont été faites en générant des adénovirus recombinants (rAdVs) exprimant les protéines de fusion P97c-GP-5 (Glycoprotéine 5) du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) et la P97c avec la protéine de capsid (Cap) du circovirus porcin de type 2 (P97c-Cap). Des réponses d'anticorps spécifiques ont été observées contre les antigènes P97c, GP-5 et Cap chez les souris ayant reçu les vecteurs adénoviraux. De façon inattendue, l'utilisation des vecteurs adénoviraux exprimant GP-5 ou Cap fusionnée à P97c a augmenté la production d'anticorps spécifiques à GP-5 ou à la Cap, ce qui suggère un effet adjuvant de la P97c (Roques et al., 2013).

Pour une utilisation simple de la P97c comme adjuvant, les hypothèses sont qu'il est possible de produire cette protéine dans les bactéries et que la P97c est capable d'activer des éléments du système immunitaire inné. Les objectifs spécifiques du projet sont de produire la P97c dans *Escherichia coli* (*E. coli*), de la purifier, de caractériser sa structure et de démontrer sa capacité à stimuler la réponse immunitaire innée *in vitro*. Ceci est une étape essentielle pour l'utilisation ultérieure de la P97c recombinante comme adjuvant en mélange avec un antigène.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Clonage du gène P97c dans le vecteur pET-21b (+)

##### 2.1.1 Digestion du vecteur pET-21b (+) et du gène P97c par les enzymes de restriction Eco RI et XhoI

Chez les mycoplasmes, le codon codant pour l'acide aminé tryptophane se veut être un codon d'arrêt chez les bactéries, Ainsi, un gène synthétique (InVitrogen, Burlington, ON, Canada) codant pour la P97c (Fig. 12A, Annexe A) a été utilisé. Cette séquence contient des sites de restriction appropriés à des extrémités ainsi que des codons optimisés pour l'expression du résidu tryptophane dans les bactéries. Le gène synthétique ainsi que le vecteur pET-21b (+) (Novagen, EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, USA) (Fig. 13, Annexe B) ont été digérés par les mêmes enzymes de restriction Eco RI (20 000 U/ml) et XhoI (20 000 U/ml) (*New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA). Cinq µl du vecteur pET-21b (+) ont été digérés pendant 2 heures à 37°C à l'aide de 0.5 µl (10 U) de chacune des enzymes de restriction Eco RI et XhoI, et 2 µl du tampon NebBuffer Eco RI 10X (*New England Biolabs*) dans un volume final de 20 µl complété avec de l'eau distillée et déionisée. Un µl du gène P97c (500 ng/µl) a été digéré pendant 2 heures à 37°C à l'aide d'un µl (20 U) de chacune des enzymes de restriction Eco RI et XhoI, et 2 µl du tampon NebBuffer Eco RI 10X, dans un volume final de 10 µl suite à l'ajout d'eau distillée stérilisée. A noter que le vecteur pET-21b (+) a une étiquette 6 histidines (6-His) de son côté C-terminal.

### 2.1.2 Purification des produits de digestion

Les produits de digestion ont été migrés sur un gel d'agarose 1% dans le tampon Tris-acétate-Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) 1X (TAE) (voir annexe C). La purification a été effectuée par l'extraction de l'ADN à partir du gel en utilisant le kit *Nucleospin® Gel and PCR clean-up* (MACHEREY-NAGEL Inc., Bethlehem, PA, USA). Brièvement, les fragments d'ADN ont été coupés à partir du gel suite à une visualisation sous les rayons UV, puis solubilisés dans deux tubes eppendorf à 42°C pendant 10 minutes dans le tampon NTI (200 µl du tampon pour 100 mg du gel) fourni avec le kit. Les solutions ont été transférées sur des colonnes. Une centrifugation a été effectuée pendant une minute à 11 000 x g. La membrane de la colonne a été lavée deux fois en ajoutant 700 µl du tampon de lavage NT3 fourni avec le kit. Une centrifugation a été effectuée entre chaque lavage. Pour sécher la membrane, une centrifugation de plus a été effectuée. L'élution de l'ADN a été effectuée par incubation de l'ADN dans la colonne avec 20 µl du tampon d'élution NE fourni avec le kit pendant une minute à température ambiante suivi d'une centrifugation. L'ADN a été stocké à -20°C.

### 2.1.3 Ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-21b (+) digéré

La ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-21b (+) digéré a été effectuée à la température ambiante toute la nuit, dans les ratios 1 : 3 (1 µl vecteur : 3 µl insert) en présence de 400 U de l'enzyme T4 ADN ligase (400 000 U/ml) (*New England Biolabs*) et d'un µl du tampon de réaction de la ligase (10X) (*New England Biolabs*) dans un volume final de 10 µl.

### 2.1.4 Transformation bactérienne par le produit de ligation



Cinq  $\mu\text{l}$  du produit de ligation ont été ajoutés à un tube de bactéries compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$  UltraMax (InVitrogen). Celles-ci ont été incubées 30 minutes sur glace, puis un choc thermique d'une minute à 42°C a été effectué, suivi d'une incubation d'une minute sur glace. Par la suite, 200  $\mu\text{l}$  de milieu de culture *Luria Bertani* (L-B) (voir annexe C) ont été ajoutés puis incubés pendant une heure à 37°C sous agitation constante de 250 rpm. Les bactéries ont ensuite été étalées sur un p $\acute{e}$ tri contenant du milieu L-B Agar (500 ml Agar, 2 ml d'ampicilline [50 mg/ml]). Les p $\acute{e}$ tri ont été incubés en position inversée à 37°C pendant une nuit.

#### 2.1.5 Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$

La vérification de l'insertion du produit de ligation dans les bactéries compétentes a été effectuée en utilisant la technique de mini extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline (Sambrook et al., 1989). Les colonies blanches obtenues à l'étape précédente ont été inoculées dans un tube de culture de 15 ml contenant 2 ml du milieu L-B avec 50 mg/ml d'ampicilline, puis incubées pendant une nuit à 37°C sous agitation constante de 250 rpm. Ensuite, 1,5 ml des cultures bactériennes ont été récupérés dans des tubes eppendorf puis centrifugés à 5 500 x g pendant 5 minutes. Le culot de bactéries a été resuspendu dans 100  $\mu\text{l}$  de la solution P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0 et 10 mM EDTA pH 8,0). Afin de permettre la lyse, 100  $\mu\text{l}$  de la solution P2 (0,2 M NaOH ; 1% SDS) ont été ajoutés puis mélangés par inversion jusqu'à ce que le mélange soit translucide. Puis 100  $\mu\text{l}$  de la solution P3 (3 M acétate de potassium, 2 M acide acétique glacial, H<sub>2</sub>O) ont été ajoutés et le mélange a été inversé 2 à 3 fois, puis la solution a été déposée sur la glace pendant 10 minutes. Ensuite, une centrifugation a été réalisée à 20 000 x g pendant 12 minutes. Par la suite, le surnageant a été mélangé à 300  $\mu\text{l}$  de tampon de liaison (500 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 200 mM EDTA pH 8,0 ; 6 M guanidine-HCl) puis transféré sur une colonne préparée préalablement avec 400  $\mu\text{l}$  de la suspension de la terre diatomée (voir annexe C). La colonne a été centrifugée à 20 000 x g pendant une minute puis lavée avec 600  $\mu\text{l}$  du



tampon de lavage (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 5 mM EDTA pH 8,0 ; 200 mM NaCl ; éthanol 100% ; H<sub>2</sub>O). Après le lavage, deux centrifugations successives de 20 000 x g pendant une minute ont été effectuées pour bien sécher la colonne. L'ADN a ensuite été élué par centrifugation dans 30 µl du tampon TE 0,1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA pH 8,0) après incubation d'une minute à température ambiante. La vérification de l'insertion du fragment désiré a été réalisée par une digestion à l'aide des enzymes de restriction Eco RI et XhoI. Pour ce faire, 5 µl de l'ADN obtenu ont été incubés pendant 2 heures à 37°C en présence d'un µl (20 U) de chaque enzyme dans le tampon NebBuffer Eco RI 1X et du *Bovine Serum Albumin* 1X (BSA), dans un volume final de 20 µl. L'analyse des fragments obtenus a été effectuée à l'aide d'un gel d'agarose 1% dans le tampon TAE 1X. Afin de s'assurer de la séquence des clones obtenus, 8 µl d'ADN obtenu par la mini extraction d'ADN plasmidique a été séquencé (Centre institutionnel de Génome Québec de l'Université McGill, Montréal, Canada).

#### 2.1.6 Transformation bactérienne des bactéries *E. coli* Rosetta-Gami

La transformation des bactéries *E. coli* Rosetta-Gami (Novagen) a été réalisée selon la technique décrite à la section 2.1.4 en utilisant 3 µl de la mini extraction d'ADN plasmidique.

#### 2.1.7 Vérification de la présence du plasmide dans les bactéries *E. coli* Rosetta Gami

Afin de s'assurer de l'insertion de l'ADN obtenu par la mini extraction d'ADN plasmidique dans les bactéries, une lyse de ces bactéries suivie d'une mini extraction d'ADN plasmidique a été effectuée selon la technique décrite à la section 2.1.5. Ensuite une digestion par les enzymes de restriction Eco RI et XhoI et une

migration sur gel d'agarose 1% ont été effectuées selon la technique décrite à la section 2.1.5.

#### 2.1.8 Production de la protéine recombinante P97c dans les bactéries *E. coli* Rosetta Gami

Afin de produire la protéine recombinante P97c, une pré-culture des bactéries Rosetta Gami obtenues par transformation bactérienne (section 2.1.6) a été effectuée dans 1 ml du milieu de culture *Super Optimal Broth* (SOB) (voir annexe C) avec 50 mg/ml d'ampicilline à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, une culture de 20 ml a été préparée jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) de 0,5 à 600 nm. Les bactéries ont ensuite été induites avec 1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 1,5 heure à 37°C. Dix ml de la culture ont été incubés en absence d'IPTG pour servir de témoin non induit. Après l'induction, une centrifugation des bactéries induites et non induites a été réalisée à 2 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots bactériens ont ensuite été lysés dans 1 ml du tampon BugBuster (Novagen) en ajoutant 25 U de benzonase (Novagen), un  $\mu$ g de lysosyme (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) et des inhibiteurs de protéase (1X) (*Complete-Mini EDTA-Free*, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) pendant 20 minutes à température ambiante avec agitation. Puis une centrifugation a été effectuée à 2000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Un échantillon des surnageants a été utilisé pour un test d'immunobuvardage.

#### 2.1.9 Analyse par immunobuvardage des surnageants des bactéries *E. coli* Rosetta Gami induites et non induites

L'analyse par immunobuvardage a été réalisée pour vérifier la production de la protéine P97c. Dix  $\mu$ l de chaque surnageant (induit et non induit) ont été mélangés avec 2  $\mu$ l du tampon de charge (900  $\mu$ l de Laemmli 5X et 100  $\mu$ l de dithiothreitol

(DTT) 1M puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Le mélange a ensuite été laissé pendant 5 minutes sur glace. Puis les échantillons ont été fractionnés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) 12% et migrés pendant 1,5 heure à 140 V dans un tampon de migration (voir annexe C). Par la suite, le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose imbibée par le tampon de transfert (voir annexe C). Le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été réalisé pendant 2 heures à 200 mA. Après le transfert, la membrane a été incubée dans du lait 5% (lait écrémé Carnation; *Phosphate buffer saline* (PBS) 1X (voir annexe C); 0,1% Tween-20) pendant une heure à température ambiante avec agitation pour saturer les sites non occupés par les protéines. Ensuite, la membrane a été incubée avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-P97c (grâceuseté du Dr. Carl Gagnon, Université de Montréal) à une dilution de 1/500 dans du lait écrémé 5%. Un réplica de la membrane a été aussi incubé avec un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-Histidine (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) utilisé à une dilution de 1/2 000 dans du lait écrémé 5%. Les deux membranes ont été incubées pendant 1,5 heure à température ambiante avec agitation, suivi de leur lavage avec du PBS-tween 0,05% répété 4 fois (5 minutes pour chaque lavage). Par la suite, une incubation avec l'anticorps secondaire de chèvre IgG anti-murine couplé à la peroxydase de raifort (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnologies) (1/10 000) a été effectuée. La membrane réplica a été aussi incubée avec l'anticorps secondaire de chèvre IgG anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnologies) utilisé à la dilution 1/5 000. Les incubations ont été réalisées dans du lait écrémé 5 % pendant 1,5 heure à température ambiante avec agitation. Un deuxième lavage a été effectué avec du PBS-tween 0,05% répété 4 fois (5 minutes pour chaque lavage). Le signal a été détecté par incubation de la membrane dans 2 ml d'une solution chimiluminescente (ECL) (Bio-Rad Laboratories Inc., Montréal, Qc, Canada) pendant 5 à 10 minutes. La membrane a ensuite été exposée au film d'autoradiographie HyBlot CL<sup>®</sup> (Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ, USA) pendant une minute.



#### 2.1.10 Purification d'extraits de protéines sur une colonne de résine chargée-Ni avec affinité à l'étiquette Histidine

Suite à la lyse des bactéries *E. coli* Rosetta Gami, l'extrait protéique a été incubé avec 300 µl de la résine *Profinity<sup>TM</sup> IMAC Ni-charged* (Bio-Rad) préalablement équilibrée avec le tampon de lavage [10 mM Imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada); 300 mM NaCl; 0,4% NonidetP-40 (NP-40) (Sigma-Aldrich); PBS 1X] pendant une nuit à 4°C. Ensuite, le surnageant a été passé à travers la colonne par gravité puis récupéré. Il a été appelé le *Flow Through* (FT). Par la suite, la résine a été lavée 4 fois avec 1 ml du tampon de lavage, puis l'élution de la protéine a été effectuée 4 fois avec 100 µl du tampon d'élution (500 mM Imidazole; 300 mM NaCl; PBS 1X).

#### 2.1.11 Analyse par immunobuvardage des produits de purification

L'analyse des produits de purification obtenus à l'étape précédente a été effectuée selon la technique décrite à la section 2.1.9. Un deuxième gel a été préparé puis colorié au bleu de Coomassie.

### 2.2 Clonage du gène P97c dans le vecteur pET-22b (+)

#### 2.2.1 Amplification du gène synthétique de P97c par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification du gène synthétique de P97c a été réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces nucléotidiques sens 5'-P-TACCCCATGGATATGAAGGAAT-3'OH et anti-sens 5'-P-CCAGCTCGAGTT-TAGATTCTG-3'OH dans le but de changer le site de clivage de l'enzyme de restriction Eco RI par celui de l'enzyme de restriction NcoI. La réaction a été



effectuée dans 5 µl du tampon de réaction standard Taq (10X) (*New England Biolabs*), 1 µl de chacun des amorces (10 µM), 1 µl de la dilution 1/10 d'un mélange de deoxynucléotides (dNTP) (10 mM) (*New England Biolabs*), 1 µl du gène synthétique de P97c (500 ng/µl) et 0,5 µl de la *One Taq DNA Polymerase* (5 000 U/ml) (*New England Biolabs*) pour un volume final de 50 µl. Un tube témoin ne contenant pas le gène synthétique a été préparé en parallèle avec les mêmes volumes pour tous les produits. Les échantillons ont été par la suite déposés dans un appareil à cycle de température programmable. Les tubes ont été amenés à une température de 94°C pendant 30 secondes, puis 25 cycles successifs de températures ont été effectués comprenant 1) une dénaturation de l'ADN durant 30 secondes à 94°C ; 2) un appariement des amorces nucléotidiques à 58°C durant une minute ; et 3) la synthèse des brins complémentaires à 68°C pendant une minute. Une incubation finale de 5 minutes à 68°C a été par la suite effectuée.

## 2.2.2 Purification du produit de PCR

La purification du produit de PCR a été réalisée en utilisant le kit *Nucleospin® Gel and PCR clean-up*. Brièvement, 100 µl du tampon NTI a été ajouté à 50 µl de la PCR. La solution a été transférée sur une colonne fournie avec le kit. Une centrifugation a été effectuée pendant une minute à 11 000 x g. La membrane de la colonne a été lavée deux fois en ajoutant 700 µl du tampon de lavage NT3. Une centrifugation a été effectuée entre chaque lavage. Pour sécher la membrane, une centrifugation de plus a été effectuée. L'élution de l'ADN a été effectuée par incubation de l'ADN dans la colonne avec 30 µl du tampon d'élution NE pendant une minute à température ambiante puis une centrifugation. L'ADN a été stocké à -20°C.

## 2.2.3 Digestion du vecteur pET-22b (+) et du gène P97c de la PCR par les enzymes de restriction XhoI et NcoI

Le gène synthétique de la P97c provenant de la PCR ainsi que le vecteur pET-22b (+) (Invitrogen) (voir annexe B) ont été digérés par les mêmes enzymes de restriction NcoI (10 000 U/ml) (*New England Biolabs*) et XhoI (20 000 U/ml). Huit µl du vecteur pET-22b (+) ainsi que 8 µl du gène P97c ont été digérés pendant 2 heures à 37°C à l'aide d'un µl de chacune des enzymes de restriction NcoI et XhoI, et 2 µl du tampon NebBuffer 3,1 (*New England Biolabs*) dans un volume final de 20 µl. A noter que le vecteur pET-22b (+) a une étiquette 6-His de son côté C-terminal. Par la suite, une purification de l'ADN digéré a été effectuée selon la technique décrite à la section 2.2.2 en utilisant 40 µl du tampon NTI.

#### 2.2.4 Ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-22b (+) digéré

La ligation du gène P97c digéré au vecteur pET-22b (+) digéré a été effectuée à la température ambiante pendant 16 heures, dans les ratios 1 : 1 (1 µl vecteur : 1 µl insert) en présence de 400 U de l'enzyme T4 ADN ligase et du tampon de réaction de la ligase 1X dans un volume final de 10 µl.

#### 2.2.5 Transformation des bactéries *E. coli* DH5α par le produit de ligation

Trois µl du produit de ligation ont été ajoutés à un tube de bactéries compétentes *E. coli* DH5α UltraMax selon la technique décrite à la section 2.1.4 pour la vérification de l'insertion du produit de ligation et le séquençage.

#### 2.2.6 Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries *E. coli* DH5α

La vérification de l'insertion du produit de ligation dans les bactéries par la technique de mini extraction d'ADN plasmidique ainsi que le séquençage ont été effectués selon les procédures décrites à la section 2.1.5. La vérification de l'insertion du fragment voulu a été réalisée par une digestion à l'aide des enzymes de restriction

NcoI et XhoI. Pour ce faire, 4 µl de l'ADN obtenu ont été digérés pendant 2 heures à 37°C à l'aide de 2,5 U de NcoI et 5 U de XhoI dans le tampon NebBuffer 3,1 dans un volume final de 10 µl. L'analyse des fragments obtenus a été effectuée à l'aide d'un gel d'agarose 1%. Huit µl d'ADN obtenu par la mini extraction d'ADN plasmidique a été séquencé afin de s'assurer de la séquence des clones obtenues (Centre institutionnel de Génome Québec de l'Université McGill).

#### 2.2.7 Transformation bactérienne des bactéries *E. coli* BL21 DE3

La transformation bactérienne de *E. coli* BL21 DE3 (Invitrogen) a été réalisée selon la technique décrite à la section 2.1.4 en utilisant 3 µl de la mini extraction d'ADN plasmidique.

#### 2.2.8 Vérification de l'insertion du fragment dans les bactéries *E. coli* BL21 DE3

Afin de s'assurer de l'insertion de l'ADN obtenu par la mini extraction d'ADN plasmidique dans les bactéries compétentes *E. coli* BL21 DE3, une lyse de ces bactéries suivie d'une mini extraction d'ADN plasmidique a été effectuée selon la technique décrite à la section 2.1.5. Ensuite une digestion par les enzymes de restriction NcoI et XhoI et une migration sur gel d'agarose 1% ont été effectuées selon la technique décrite à la section 2.1.5.

#### 2.2.9 Production de la protéine recombinante P97c par induction des bactéries *E. coli* BL21 DE3

La production de la protéine P97c a d'abord été testée à une petite échelle. Pour ce faire, 2 ml d'une culture de bactéries *E. coli* BL21 DE3 ont été induits par 0,6 mM d'IPTG à DO de 0,9 à 600 nm pendant 3 heures à 37°C. Deux ml de culture ont été incubés en absence d'IPTG pour servir de bactéries témoins non induites. Après la



lyse périplasmique (voir section 2.2.10), le surnageant ainsi que le culot bactérien lysé des bactéries induites et non induites ont été fractionnés sur un gel SDS-PAGE 12% et analysés par immunobuvardage. Par la suite, une culture à plus grande échelle a été réalisée. Une pré-culture de 100 ml a été effectuée dans du milieu L-B avec 50 mg/ml d'ampicilline pendant la nuit à 37°C. Le lendemain, une culture de 2 L a été effectuée jusqu'à une DO de 0,9 à 600 nm. Les bactéries ont ensuite été induites dans les mêmes conditions. Après l'induction, une centrifugation des bactéries a été réalisée à 10 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot bactérien a ensuite été stocké à -20°C pour la lyse.

#### 2.2.10 Lyse périplasmique des bactéries induites

Le culot obtenu de 2 L des bactéries induites a été resuspendu avec 800 ml (0,4 fois le volume de la culture initiale) du tampon Tris-HCl (30 mM) 20% sucrose avec de l'EDTA pH 8,0 à une concentration finale de 1 mM. Le mélange a été ensuite incubé à température ambiante pendant 10 minutes avec une agitation douce à 150 rpm. Par la suite, une centrifugation a été réalisée à 17 600 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été remis en suspension avec 800 ml de MgSO<sub>4</sub> (5 mM) et incubé pendant 10 minutes sur glace avec agitation à 150 rpm. A cette étape, les protéines périplasmiques ont été libérées dans le tampon. Une deuxième centrifugation a été réalisée à 17 600 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été lyophilisé avant d'être utilisé pour les étapes subséquentes.

#### 2.2.11 Lyse totale et sonication des bactéries induites

Le culot d'un litre de bactéries induites a été lysé dans 100 ml du tampon P1 (0,5% Tween-20 ; 0,5% Triton X-100 ; 0,5% NP-40 ; PBS) et 6,5 ml du tampon P2 (200 mM NaOH ; 1% SDS) en présence de 25 U de benzonase (Novagen), 1 µg de lysosyme (Sigma) et des inhibiteurs de protéase 1X pendant 20 minutes à température



ambiante avec agitation. Par la suite, une sonication par un *Ultrasonic Dismembrator* (Fisher Scientific, modèle 100, 50/60 Hz) à puissance maximale sur glace a été réalisée avec une activation de la sonde réalisée en trois étapes : 1) activation de la sonde pour 30 secondes suivi d'un repos de 30 secondes répétée 3 fois ; 2) activation de la sonde pour une minute suivi d'un repos d'une minute, répétée 2 fois ; et 3) activation de la sonde pour une seconde suivi d'un repos d'une seconde pendant 1 minute, répétée 2 fois. Enfin, une centrifugation à 17 600 x g a été effectuée pendant 30 minutes à 4°C.

#### 2.2.12 Purification des lysats sur une colonne de résine chargée-Ni avec affinité à l'étiquette Histidine

La poudre du surnageant lyophilisé a été dissoute dans 2 ml d'eau et dialysée pendant 2 heures puis pendant une nuit contre du PBS 1X à 4°C avec agitation. Les produits des deux lyses périplasmique et totale ont été ensuite purifiés sur la résine *Profinity<sup>TM</sup> IMAC Ni-charged* (Bio-Rad) tel que décrit à la section 2.1.10 en utilisant le même tampon de lavage exempt de NP-40.

#### 2.2.13 Analyse par immunobuvardage des produits de purification

Les produits de purification obtenus à l'étape précédente ont été analysés par immunobuvardage selon la technique décrite à la section 2.1.9. Un deuxième gel a été préparé puis coloré au bleu de Coomassie.

#### 2.2.14 Chromatographie d'exclusion stérique

Une colonne de filtration sur gel Superdex 75 HR 10/30 calibrée (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe, Québec, Canada) a été utilisée pour séparer les protéines obtenues suite à la purification, selon leur taille moléculaire. La phase

mobile utilisée a été le PBS. Les éluats ont été détectés par absorbance à 280 nm et recueillis en des fractions de 1 mL. Les fractions contenant la protéine désirée ont été analysées par immunobuvardage puis lyophilisées, et celles de la lyse totale ont été stockées à -20°C.

#### 2.2.15 Dosage des protéines

Les protéines des fractions qui ont été lyophilisées ont été remises en suspension dans de l'eau milli-Q pour être dosés. Le dosage des protéines a été réalisé en triplicata à l'aide du kit *DC protein assay* (Bio-Rad). Pour ce faire, 5 µl de l'échantillon à doser ont été déposés dans un plateau de 96 puits à fond plat (Bio-rad), puis 25 µl de la solution A (1 ml de tartrate de cuivre alcaline + 20 µl de réactif S) ont été ajoutés, ainsi que 200 µl de réactif B (réactif de Folin). La plaque a été ensuite incubée pendant 15 minutes à température ambiante, puis la lecture de l'absorbance a été effectuée à 750 nm à l'aide d'un lecteur de plaque. La courbe standard a été réalisée à l'aide d'une concentration de BSA connue, soit 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 1,2 mg/ml et 1,4 mg/ml, afin d'établir la concentration des protéines de chaque fraction.

#### 2.2.16 Dichroïsme circulaire (CD)

Les protéines lyophilisées ont été solubilisées dans du tampon PBS à une concentration finale de 15 µM. Tous les spectres ont été enregistrés à 25°C à l'aide d'un spectromètre J-815 CD (Jasco Applied Sciences, Anchorage, AK, USA) de 195 à 260 nm à tous les 0.5 nm. Le balayage a été d'une durée moyenne de 10 s à chaque longueur d'onde. Chaque spectre a été ajusté par la soustraction du bruit de fond de l'échantillon sans protéines. Chaque spectre correspond à la moyenne d'au moins deux lectures indépendantes. Les spectres ont été enregistrés après le dépôt des

échantillons dans une cellule de quartz de 2 mm de chemin optique. L'ellipticité moyenne par résidus est exprimée en millidegré (mdeg).

### 2.3 Génération de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BmDCs) de souris C57BL/6 et leurs activation

Des souris C57BL/6 femelles âgées de six à huit semaines ont été utilisées (Charles River Laboratory, St-Constant, Qc, Canada) pour l'obtention des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris (bmDCs) selon une technique décrite précédemment (Inaba et al., 1992; Lecours et al., 2011; Lecours et al., 2012). Pour ce faire, les cellules totales de la moelle osseuse ont été récupérées des fémurs et des tibias et ont été mises en culture dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) complet contenant 5% de sérum de veau fœtal (FBS) (PAA Laboratories Inc., Etobicoke, Ontario, Canada), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 20 µg/ml de Gentamicine et 50 µM de 2-ME. Le milieu complet a été en plus supplémenté avec 20 ng/ml de GM-CSF recombinant (eBioscience, San Diego, CA, USA). Cinq ml de cellules ( $2,5 \times 10^5$  cellules/ml) ont été mis en culture dans chacun des puits d'une plaque à six puits (Corning, Kennebunk, ME, USA) durant 7 jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Aux jours 3 et 5, un changement de milieu RPMI contenant 10 ng/ml de GM-CSF recombinant a été effectué. Au jour 7, les agglomérats de cellules ont été récoltés délicatement à l'aide d'une pipette. Les cellules ont été remises en culture pour la nuit dans du milieu RPMI supplémenté avec 10 ng/ml de GM-CSF recombinante afin d'éliminer les cellules adhérentes.

Au jour 8, les cellules non adhérentes ont été récupérées, lavées et une suspension cellulaire de  $2 \times 10^6$  cellules/ml a été préparé dans du milieu RPMI avec 10% de FBS et 10 ng/ml de GM-CSF recombinante. Dans des plaques de 24 puits (Sarstedt Inc.), une quantité de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été déposée. Ensuite, différentes concentrations de la protéine P97c ont été ajoutées (100, 500 ng/ml et 1, 2,



5 µg/ml) en présence et/ou en absence de la polymyxine B (20 µg/ml) (Invivogen, San Diego, California, USA). Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub> et le surnageant a été récupéré et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation. Des cellules non stimulées ainsi que des cellules stimulées avec de l'ovalbumine (OVA) (50 ng/ml) (Invivogen) ont servi de témoins négatifs. Des cellules stimulées avec du CpG (1 µM) (Invivogen), du LPS (1 µg/ml) (Sigma), du LPS-EB ultra pure (monophosphoryl lipid A) (1 µg/ml) (Invivogen) et de la flagelline (FliC Vaccingrade) (1 et 2 µg/ml) (Invivogen) ont servi de témoins positifs.

## 2.4 Cytométrie en flux

La pureté des bmDCs a été déterminée par cytométrie en flux. Un million de cellules ont été centrifugées à température ambiante pendant 5 minutes à 600 g. Elles ont été ensuite resuspendues dans 100 µl d'anticorps anti-souris CD11c (dilution 1/100) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) clone N418 (eBioscience) utilisé comme marqueur puis incubées pendant 20 minutes à 4°C. Une deuxième centrifugation a été effectuée et les cellules ont été resuspendues dans 400 µl de PBS. Une pureté de 80-85% de cellules CD11c<sup>+</sup> a été obtenue par analyse au cytomètre (Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

## 2.5 Quantification des cytokines IL-6 et TNF-α

La production de TNF-α et d'IL-6 a été mesurée dans le surnageant des cultures de bmDCs après 18 heures de stimulation, en utilisant l'ensemble ELISA *Development kit* (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) selon le protocole du fournisseur. Brièvement, les plaques de 96 puits (Costar Well Half Area High Binding, Corning) ont été adsorbées avec l'anticorps de capture (TNF-α : 1 µg/ml et IL-6 : 2 µg/ml) dans du PBS, pH 7,3, et incubées à température ambiante toute la nuit. Par la suite, les plaques ont été bloquées avec du PBS contenant 1% de BSA. Ensuite, du standard et

des échantillons ont été ajoutés en triplicata suivi d'une incubation de 2 heures à la température ambiante. L'anticorps de détection (TNF- $\alpha$  : 0,25 $\mu$ g/ml et IL-6 : 0,5 $\mu$ g/ml) a ensuite été ajouté pour une incubation de 2 heures à la température ambiante. L'avidine peroxidase (1/2 000) a été ajoutée pour une incubation de 30 minutes à la température ambiante. Le signal de la peroxidase a été détecté avec le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Life Technologies) à une DO de 405 nm. Pour chaque échantillon, la DO des puits témoins (non-adsorbé) a été soustraite.

## 2.6 Analyse statistique

Pour les résultats d'ELISA, les données ont été analysées en utilisant une analyse de la variance ANOVA à une variable, suivi d'un post-test de Bonferroni en comparant tous les colonnes à OVA pour des analyses statistiques entre les moyennes des différentes conditions. Une valeur  $P < 0,05$  été utilisée comme seuil de signification.

## CHAPITRE III

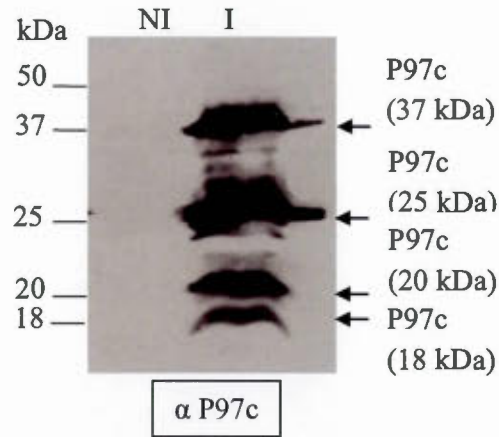
### RÉSULTATS

#### 3.1 Expression du gène codant la P97c par le vecteur pET-21b (+)

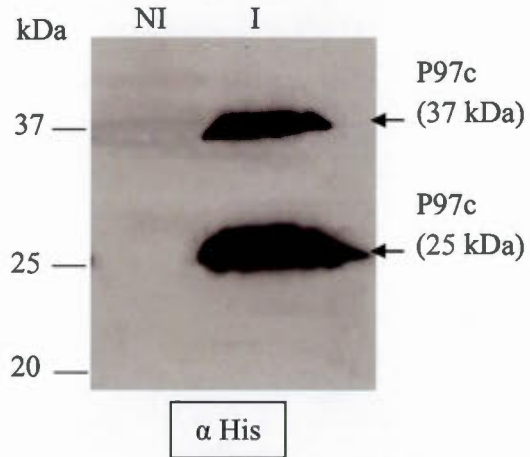
La protéine P97c a d'abord été exprimée dans des bactéries via le vecteur pET-21b (+). Suite à une induction de 1,5 heure avec un 1 mM d'IPTG des bactéries *E. coli* Rosetta Gami (croissance équivalente à une D.O. de 0,5), des protéines solubles ont été obtenues à partir d'un lysat bactérien tel que détecté en immunobuvardage par la présence de plusieurs bandes immunoréactives en utilisant un anticorps monoclonal murin spécifique de la P97 (Fig. 6A, ligne I). Les protéines observées ont démontré des masses moléculaires de 37, 25, 20 et 18 kDa, correspondant à la P97c entière pour la première et possiblement à des sous-produits de clivage de la P97c pour les autres. Deux bandes immunoréactives de masse moléculaire 37 et 25 kDa ont été détectées en utilisant un anticorps polyclonal de lapin spécifique à l'étiquette 6-His (Fig. 6B, ligne I). Aucune protéine correspondant à la P97c ou à un quelconque sous-fragment n'a été observée dans les bactéries non induites (Fig. 6A-B, ligne NI). La purification d'extraits protéiques des bactéries induites avec une colonne de résine chargée-Ni, tel qu'observé sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, a montré un faible rendement d'expression suite à l'analyse des éluats (Fig. 6C, lignes E1 à E4). Par contre, trois bandes immunoréactives à l'anticorps monoclonal anti-P97c avec des masses moléculaires de 37, 25 et 20 kDa (Fig. 6D, lignes E1 à E4) et deux bandes immunoréactives à l'anticorps polyclonal anti-His avec des masses moléculaires 37 et 25 kDa (Fig. 6E, lignes E1 à E4) ont été détectées par immunobuvardage.



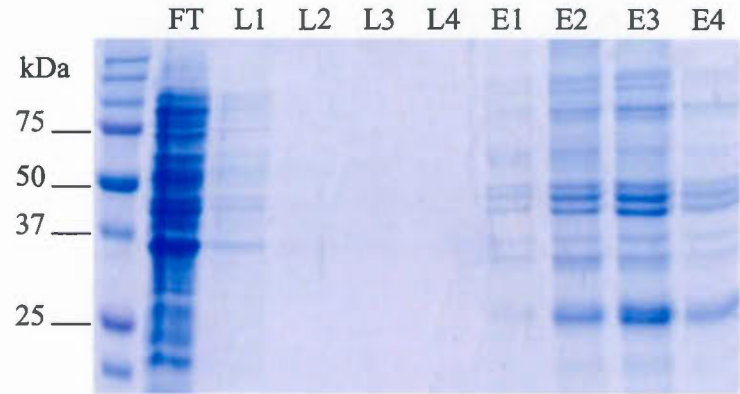
(A)

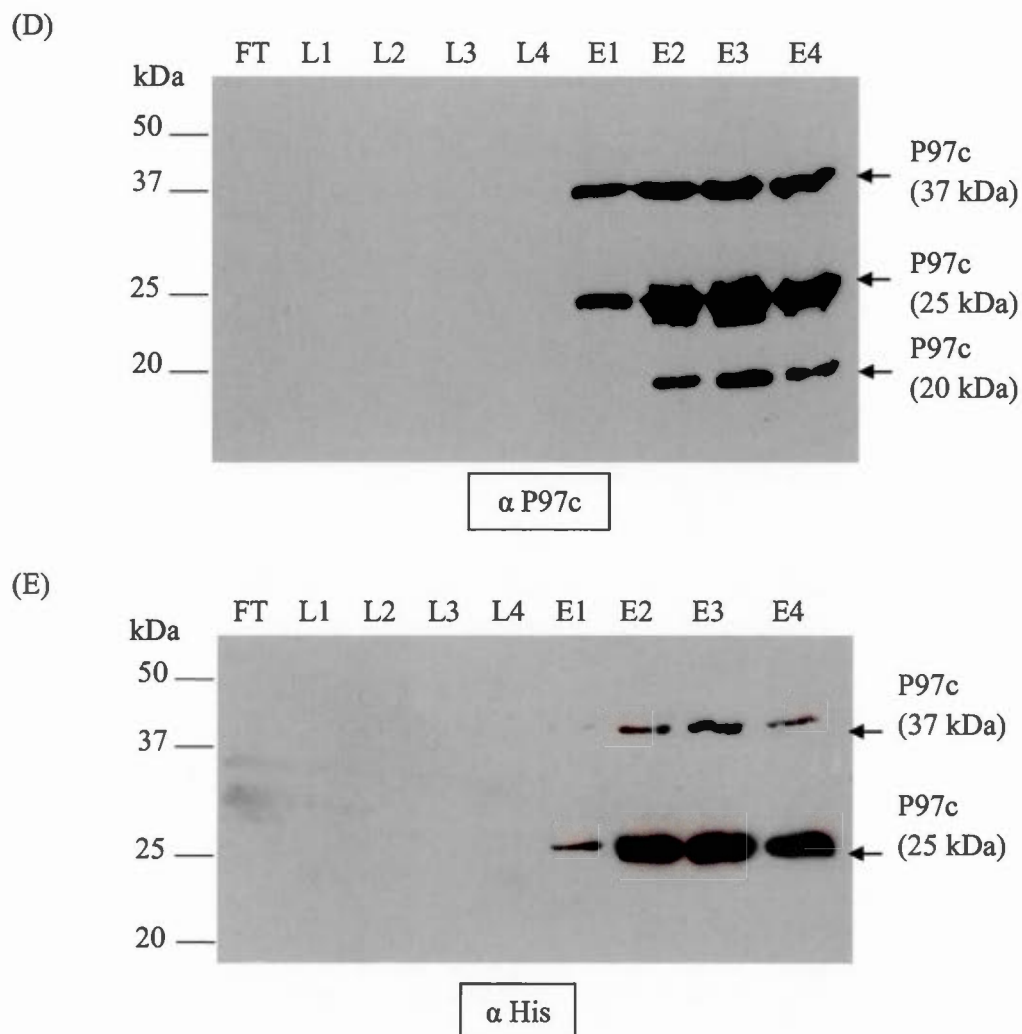


(B)



(C)





**Figure 6. Expression de la protéine P97c dans les bactéries d'*E. coli* Rosetta Gami transformées avec le vecteur pET-21b (+)**

Les protéines solubles obtenues ont été analysées par un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie (C) et par immunobuvardage (A, B, D, E) avant (A, B) et après (D, E) une purification sur une colonne de résine chargée-Ni. L'immunobuvardage (signaux en chemiluminescence) a été réalisé en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-P97c (A, D) en tant qu'anticorps primaire et un anticorps anti-IgG-HRP de souris (A, D) en tant qu'anticorps secondaire. L'immunobuvardage du replica a été réalisé en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-His (B, E) en tant qu'anticorps primaire et un anticorps anti-IgG-HRP de lapin (B, E) en tant qu'anticorps secondaire. FT: *Flow through*; L1 à L4: Lavage; E1 à E4: Éluat.

### 3.2 Expression du gène codant la P97c par le vecteur pET-22b (+)

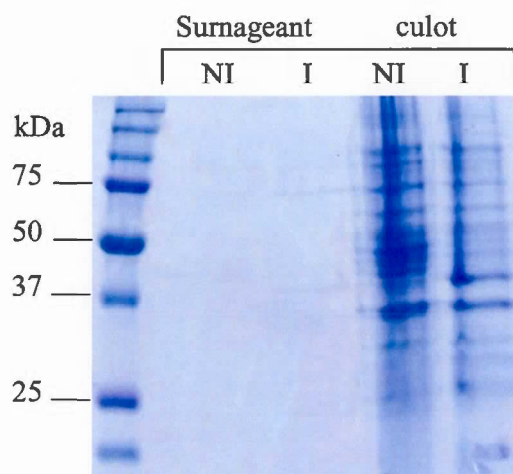
Suite à l'obtention de plusieurs bandes protéiniques et au rendement négligeable en terme de quantité, il a été décidé d'utiliser un autre vecteur d'expression en l'occurrence le vecteur pET-22b (+). Ce vecteur contient une séquence de signalisation périplasmique, ce qui permet d'exprimer la P97c dans la fraction périplasmique, un environnement favorable pour le repliement des protéines. Le gène codant la P97c a donc été cloné dans des bactéries *E. coli* BL 21 DE3. Ces bactéries sont déficientes en Lon et OmpT protéases qui peuvent dégrader les protéines durant la purification (Novagen pET system manual). La Fig. 7 représente les protéines solubles du surnageant et du culot obtenues à partir d'une lyse périplasmique de bactéries induites (volume 2 ml de bactéries, croissance à une D.O. de 0.9) avec 0.6 mM d'IPTG (Fig. 7A, B, lignes I) et non induites (Fig. 7A, B, lignes NI). La coloration du gel avec le bleu de coomassie (Fig. 7A) n'a montré aucune protéine dans la fraction surnageant alors que des protéines ont été observées dans la partie culot. L'immunobuvardage a montré deux bandes immunoréactives de P97c dans le surnageant à 37 kDa et 25 kDa alors que plusieurs bandes ont été observées dans la partie culot.

Suite à cet essai préliminaire avec un volume peu élevé de bactéries, l'expression des protéines a été réalisée à partir d'une culture bactérienne de 2 L. Tel que le démontre le gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie (Fig. 7C, éluats : lignes E1 à E4), deux bandes intenses avec des poids moléculaires de 37 et 25 kDa ont été obtenues suite au passage du lysat périplasmique sur une colonne de purification de résine chargée-Ni. Une bande de moindre intensité d'un poids moléculaire de 37 kDa a été observée dans les lavages de la colonne (Fig. 7C, lavages : L1 à L4). L'analyse par immunobuvardage avec l'anticorps de souris IgG-HRP anti-P97 a démontré la spécificité des bandes qui ont été observées sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Fig. 7D, lignes L1 à L4 et lignes E1 à E4). La

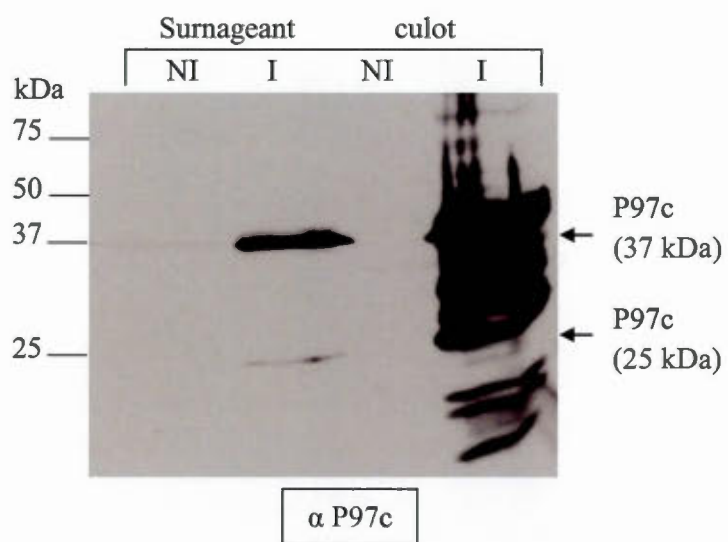


deuxième membrane qui est un réplica du gel et qui a été incubée avec l'anticorps de lapin IgG-HRP anti-Histidine, a démontré deux bandes intenses avec des poids moléculaires de 37 et 25 kDa (Fig. 7E, éluats : lignes E1 à E4). Les bandes de poids moléculaires différents sont possiblement des impuretés qui ont été éluées avec la P97c à partir de la colonne de résine chargée-Ni à cause de la forte concentration en Imidazole (500 mM). Ces impuretés ne sont pas des fractions de la P97c vu qu'elles n'ont pas été observées à la Fig. 7D avec l'anticorps monoclonal anti-P97c alors qu'elles ont été visibles à la Fig. 7E avec l'anticorps polyclonal anti-His. Elles ont été éliminées dans les déchets non collectés de la chromatographie d'exclusion stérique.

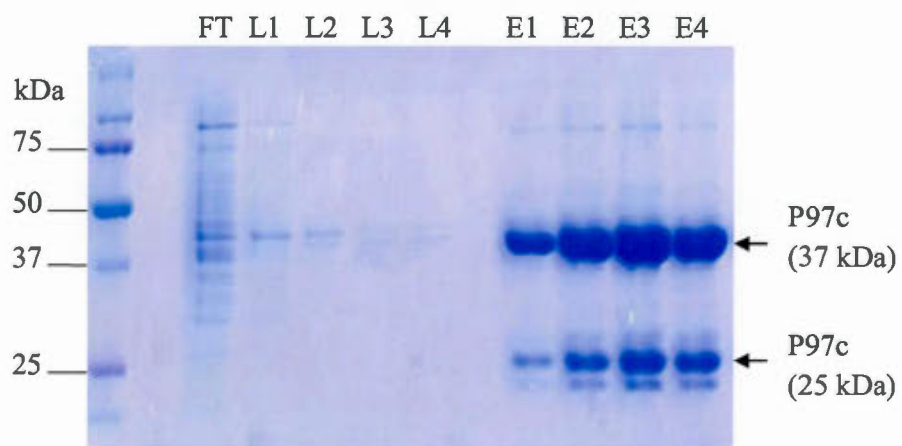
(A)



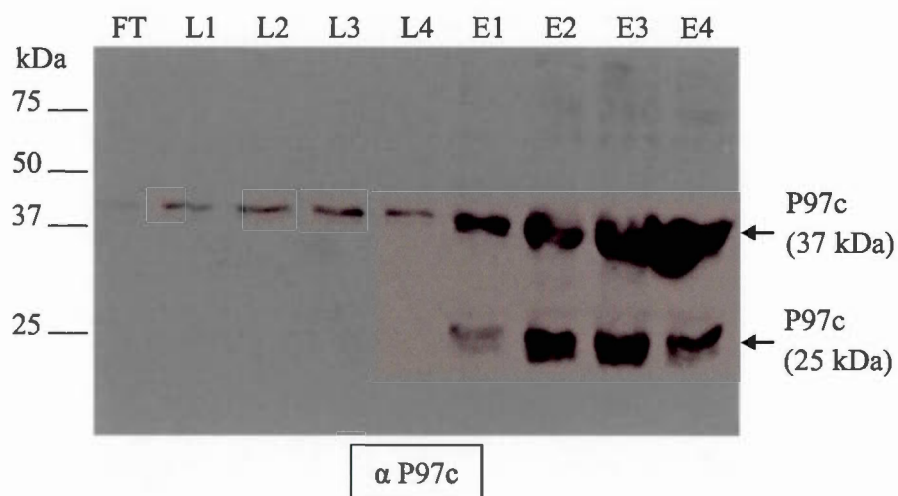
(B)



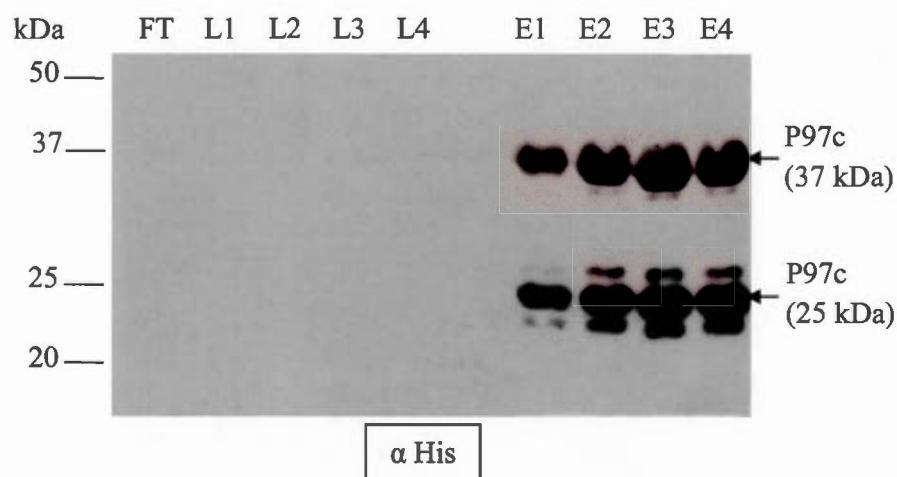
(C)



(D)



(E)



**Figure 7. Expression de la protéine P97c dans les bactéries *E. coli* BL21 DE3 transformées avec le vecteur pET-22b (+)**

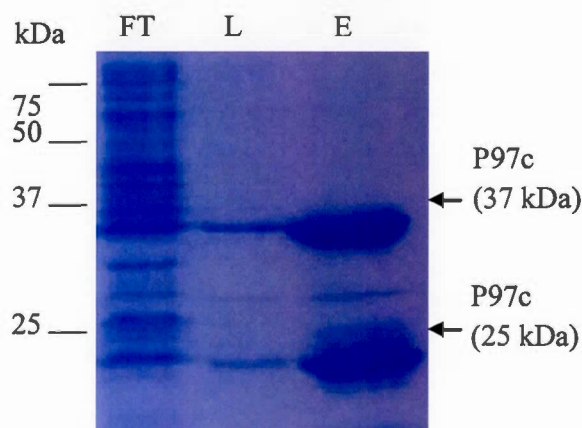
Les protéines solubles obtenues à partir de la fraction périplasmique ou les protéines présentes dans le culot (A, B) ont été analysées par gel SDS-PAGE 12% coloré au



bleu de Coomassie (A) et par immunobuvardage (B). A et B: à partir de 2 ml de culture; Les protéines obtenues après purification sur une colonne de résine chargée-Ni (C, D, E) ont été analysées par gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie (C) et immunobuvardage (D, E). C, D et E: à partir de 2 litres de culture. L'immunobuvardage (signaux en chemiluminescence) a été réalisé en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-P97c (B, D) et un anticorps polyclonal de lapin anti-Histidine (E) en tant qu'anticorps primaires et un anticorps anti-IgG-HRP de souris (B, D) et anti-IgG-HRP de lapin (E) en tant qu'anticorps secondaires. FT: *Flow through*; L1 à L4: Lavage; E1 à E4: Éluat.

### 3.3 Purification d'extrait protéique provenant de la lyse totale

Comme réalisé précédemment, un litre de bactéries *E. coli* BL21 DE3 induites (0,6 mM d'IPTG à une D.O de 0,9) ont été lysées par les tampons P1 et P2 et soniquées. Le surnageant a été ensuite purifié sur la colonne de résine chargée-Ni. Un gel coloré au bleu de Coomassie montre la purification avec deux bandes de masses moléculaires 37 et 25 kDa (Fig. 8, ligne E) avec un rendement d'expression élevé. Ces deux bandes ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique puis les protéines ont été conservées à -20°C pour les tests *in vitro*.



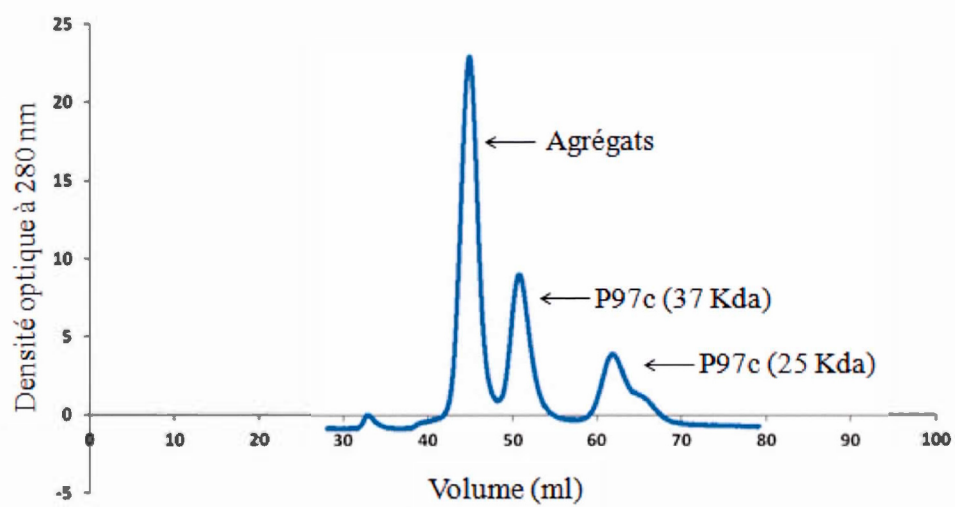
**Figure 8. Purification des protéines de la lyse totale**

Les protéines solubles obtenues par une lyse totale d'une culture de 1 L de bactéries BL21 DE3 puis soniquées ont été purifiées sur la colonne de résine chargée-Ni puis analysées par gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. FT: *Flow through*; L1 à L4: Lavage; E1 à E4: Éluat.

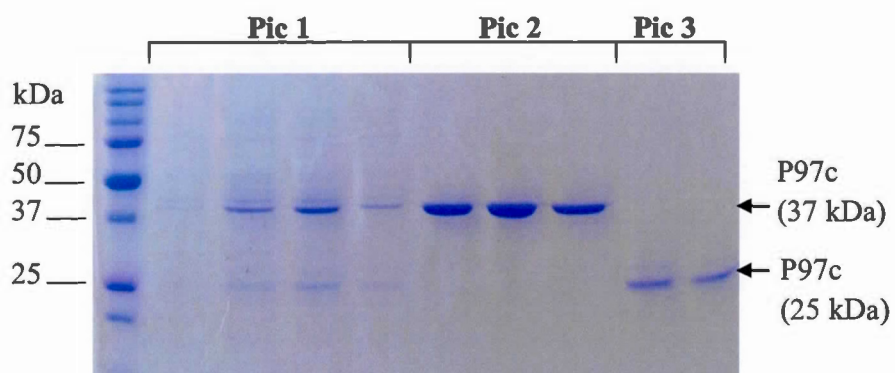
### 3.4 Séparation par chromatographie d'exclusion stérique

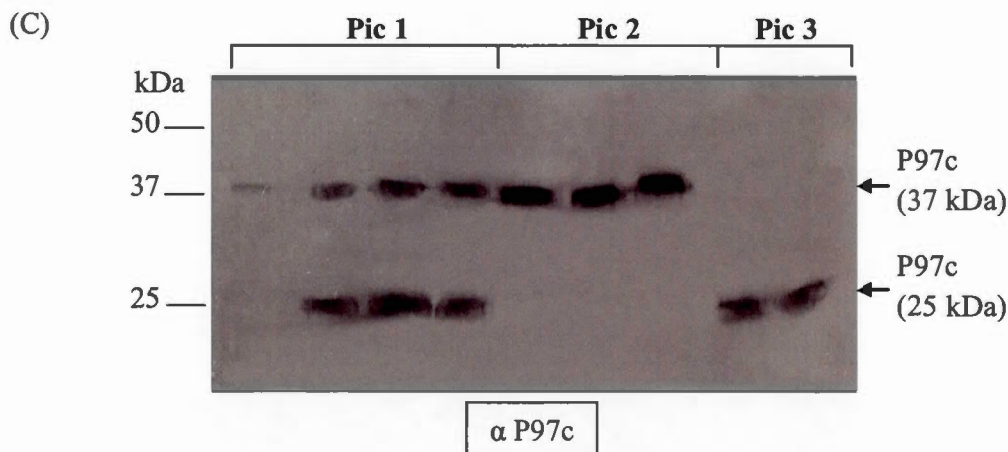
Suite aux résultats obtenus, il a été donc décidé de produire la P97c à partir du vecteur pET-22b (+) dans les bactéries *E. coli* BL21 DE3, et de purifier la P97c entière en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique après une première étape de purification sur la colonne de résine chargée-Ni. Tel que présenté dans la Fig. 9, les deux formes de P97c obtenues suite à la lyse périplasmique ont été séparées avec succès par chromatographie d'exclusion stérique en raison de leurs différences des poids moléculaires de 37 et 25 kDa. Le graphique (A) de la fig. 9 montre trois pics résultant du fractionnement des protéines. Le premier représente les protéines agrégées des deux formes recueillies dans des fractions de 1 ml (volume d'élution de 42-48 ml). Les deuxième et troisième pics représentent la P97c entière (37 kDa) (volume d'élution de 50-54 ml) et le fragment de 25 kDa de la P97c (25 kDa) (volume d'élution de 60-68 ml), respectivement. Tel que le démontre le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 9B, pics : lignes 1 à 3), les trois pics ont été obtenus suite à la séparation par chromatographie d'exclusion stérique. L'analyse par immunobuvardage a démontré la spécificité des bandes qui ont été observées sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Fig. 9C, pics : lignes 1 à 3). Ces fragments ont été lyophilisés et conservés à -80°C.

(A)



(B)





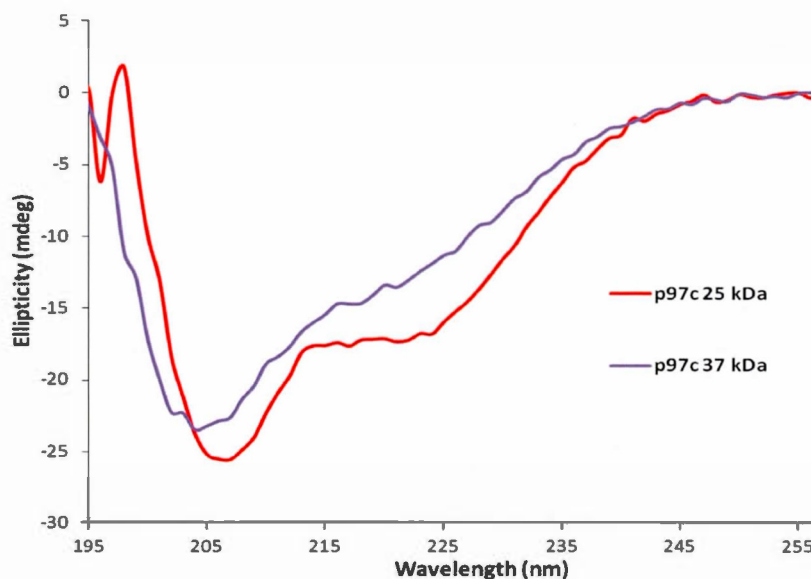
**Figure 9. Séparation des deux formes majeures de P97c exprimées à partir du vecteur pET-22b (+) par chromatographie d'exclusion stérique**

Le chromatogramme (A) montre trois maxima distincts, soit les agrégats, les fractions 37 kDa et 25 kDa respectivement. Les protéines solubles obtenues à partir de la fraction périplasmique ont été analysées par gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie (B) et par immunobuvardage (C) après lyophilisation du surnageant, solubilisation des protéines lyophilisées, dialyse puis purification sur une colonne de résine chargée-Ni. L'immunobuvardage (signaux en chemiluminescence) a été réalisé en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-P97c en tant qu'anticorps primaire, et un anticorps anti-IgG-HRP de souris en tant qu'anticorps secondaire (C).

### 3.5 Analyse structurale par dichroïsme circulaire

Pour évaluer si les protéines affichent une structure tridimensionnelle particulière, la structure secondaire de la protéine complète P97c (37 kDa) et du fragment tronqué de 25 kDa a été analysée par dichroïsme circulaire (Fig. 10). Les protéines ont été solubilisées dans du PBS à une concentration finale de 15  $\mu$ M. Le spectre CD de P97c (25 kDa) présente deux minima négatifs à 208 et 222 nm et un maximum positif à 192 nm, indiquant la présence d'une structure en hélice- $\alpha$ . Le spectre de la P97c (37 kDa) montre une conformation principalement aléatoire ou désordonnée de la protéine avec un seul minimum autour de 204 nm.





**Figure 10. Spectres de spectroscopie de dichroïsme circulaire de la P97c**

Les spectres CD de P97c (25 kDa) en rouge et P97c (37 kDa) en mauve, à une concentration finale de 15  $\mu$ M, ont été pris à température ambiante.

### 3.6 Effet de P97c (37 kDa) sur la sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$ dans des cellules dendritiques murines

La P97c obtenue par la lyse totale des bactéries BL21 DE3 a modulé la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  par les DCs tel que déterminé par ELISA. Dans la Fig. 11A, les DCs ont été stimulées en absence de polymyxine B. Les cellules non stimulées et les cellules stimulées avec l'OVA n'ont induit aucune sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Le CpG, qui stimule le TLR 9, a été utilisé comme témoin positif et a induit la sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$  à des quantités de 400 000 pg/ml et 210 000 pg/ml respectivement. Le LPS et le LPS-EB ultra pure (monophosphoryl lipide A), qui stimulent le TLR 4, ont aussi induit la sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$  à des degrés moindres. La flagelline qui a été utilisée comme témoin positif et qui stimule le TLR 5, n'a induit aucune ou une très faible

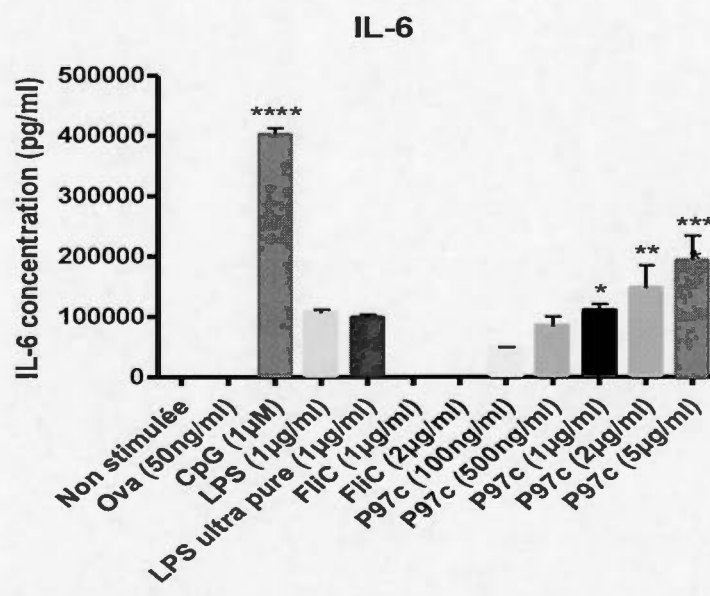
stimulation des DCs avec les deux concentrations utilisées. Par rapport à la P97c, la stimulation des DCs a été observée à partir d'une concentration de 100 ng/ml avec une quantité d'IL-6 qui a augmenté graduellement en corrélation avec l'augmentation de la concentration de la P97c. Pour la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  de la Fig. 11A, la stimulation par la P97c a été détectée aux concentrations de 100 ng/ml et 5  $\mu$ g/ml.

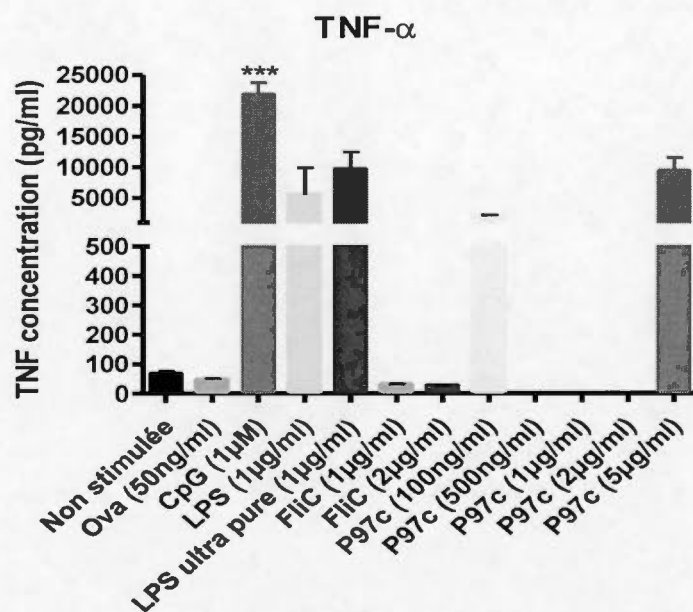
Pour déterminer si la réponse obtenue par la P97c n'était pas due à la présence de LPS provenant de la préparation, c'est-à-dire des bactéries produisant la protéine, les DCs ont été stimulées en présence de la polymyxine B qui est reconnue comme étant un inhibiteur de LPS (Cardoso et al., 2007) (Fig. 11B). Les cellules stimulées aux CpGs ont induit la sécrétion de l'IL-6 à une concentration de 500 000 pg/ml. Le LPS-EB ultra pure a été inhibé par la polymyxine B alors que le LPS n'a été que partiellement inhibé. Les mêmes résultats ont été observés pour l'IL-6 suite à la stimulation par la P97c avec des concentrations moins élevées obtenues à partir des DCs incubées en présence de polymyxine B. Pour le TNF- $\alpha$ , une faible stimulation a été observée par la flagelline. De même, la stimulation par la P97c a été observée aux concentrations de 100 et 500 ng/ml en présence de polymyxine B. Une absence de dose-réponse pour le TNF- $\alpha$  à des concentrations de P97c de 500 ng/ml, 1 et 2  $\mu$ g/ml en absence de polymyxine B (Fig. 11A) et une absence de réponse pour la P97c utilisée à des concentrations de P97c de 1 et 2  $\mu$ g/ml en présence de polymyxine B (Fig. 11B), pourraient suggérer une faible activation des DCs ou une réponse non-spécifique due à la présence d'une faible contamination d'endotoxines ou aussi un problème technique.

L'analyse statistique a montré qu'il y a une différence statistiquement significative entre les concentrations d'IL-6 obtenues suite à la stimulation des DCs à l'OVA et celles obtenues suite à la stimulation des DCs par la P97c à différentes doses (Fig. 11A et B), ce qui suggère que la P97c peut induire une réponse

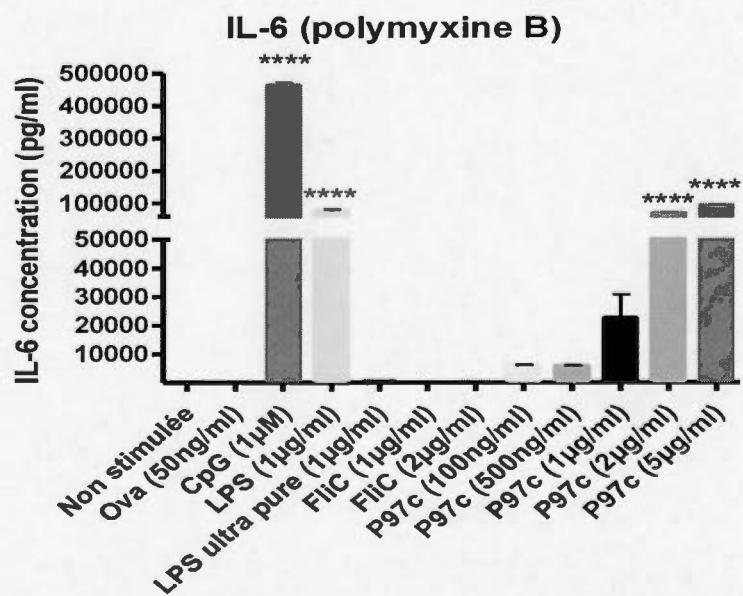
immunitaire positive. L'analyse statistique pour la TNF- $\alpha$  n'a pas pu être réalisée par manque de données, mais les graphes ont montrés une tendance des DCs à produire du TNF- $\alpha$  suite à une stimulation par la P97c (Fig. 11A).

(A)

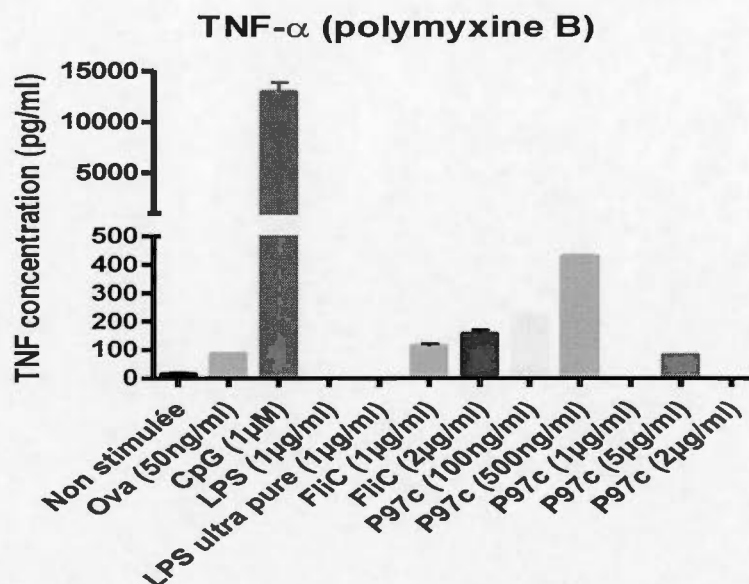




(B)







**Figure 11. Effet de la P97c complète sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires**

Les DCs ont été traitées avec la P97c (37 kDa) à différentes concentrations (100, 500 ng/ml et 1, 2, 5  $\mu$ g/ml) en absence (A) ou en présence (B) de polymyxine B à 20  $\mu$ g/ml. Les colonnes des cellules non stimulées et de l'OVA à 50 ng/ml représentent les témoins négatifs. Les colonnes des CpG à 1  $\mu$ M, LPS à 1  $\mu$ g/ml, LPS-EB ultra pure à 1  $\mu$ g/ml et la FliC VacciGrade à 1 et 2  $\mu$ g/ml représentent les témoins positifs. Le symbole (\*) représente une différence statistiquement significative ( $P < 0,05$ ) entre le groupe comparé et le témoin négatif OVA.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Un vaccin est une préparation contenant du matériel immunogène capable d'induire chez le sujet vacciné une réponse immunitaire spécifique à cet immunogène. Dans le cas d'un pathogène particulier, un vaccin a comme objectif de protéger l'hôte contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences. D'un point de vue immunologique, la vaccination consiste à générer des cellules immunitaires mémoires spécifiques à un pathogène qui permettront de combattre très rapidement ce dernier lors d'une infection naturelle. La vaccination va donc permettre d'activer la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire. La réponse humorale, conduite par les cellules B, se caractérise par la sécrétion d'anticorps qui vont contribuer à neutraliser les agents pathogènes extracellulaires. La réponse cellulaire, d'autre part, va permettre la génération de deux types principaux de cellules T : les cellules T CD8+ cytotoxiques, qui pourront tuer directement les cellules infectées par les pathogènes intracellulaires, et les cellules T auxiliaires CD4+ de type Th1, supportant entre autre la réponse des cellules T CD8+ cytotoxiques et l'activation de macrophage (Janeway et al., 2009).

La vaccination a de fait permis d'améliorer l'état de santé des populations humaines et animales à l'échelle mondiale. Les vaccins conventionnels à base d'organismes vivants atténués ou inactivés par un processus chimique présentent les inconvénients d'un regain possible de la virulence pour les premiers, ou une inactivation incomplète et une réponse immunitaire faible pour les deuxièmes. Pour contrer ces inconvénients, le développement de vaccins à base de protéines

recombinantes, un type de vaccins sous-unitaires, est une avenue qui permet d'éliminer les inconvénients de sécurité des vaccins conventionnels. Dans ce cas précis, l'utilisation d'un adjuvant est nécessaire pour induire des réponses immunitaires optimales (Brunner et al., 2010).

L'utilisation d'adjuvants dans les vaccins sous-unitaires présente les avantages d'augmenter ou prolonger la réponse immunitaire spécifique induite, de diminuer la quantité d'antigènes et de rappels nécessaires et d'orienter la réponse immune vers le profil Th1 et/ou Th2 désiré (Aguilar and Rodriguez, 2007). Les adjuvants approuvés pour usage humain incluent les sels d'aluminium (Alun) sous forme d'hydroxyde ou de phosphate, seul ou en mélange, utilisés depuis plus de 80 ans, l'AS04 (mélange de monophosphoryl lipide A et d'hydroxyde d'Al) approuvé en 2009 pour le vaccin Cervarix contre le virus du papillome humain, et le MF59® et l'AS03 (émulsions de squalène) utilisés dans des vaccins anti-grippaux (Coffman et al., 2010). Même si l'effet de dépôt local a été longtemps retenu comme mécanisme d'action de ces produits, leur effet adjuvant est aussi associé à la stimulation de la réponse innée. L'alun en particulier active l'inflammasome résultant en l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 actives (Kufer and Sansonetti, 2011).

D'autres molécules (produits bactériens, micro et nanoparticules, saponines, émulsions, acides nucléiques, etc.) exercent des effets adjuvants en augmentant la présentation de l'Ag en le protégeant de sa dégradation et/ou en modulant la réponse immunitaire induite (Leroux-Roels, 2010). Basé sur l'activation des TLRs, plusieurs adjuvants sont en voie de développement, en cours d'essais cliniques ou approuvés. Le monophosphoryl lipide A (MPL) active le TLR 4 et est utilisé en complément des sels d'Alun dans l'adjuvant approuvé AS04 (Didierlaurent et al., 2009). Il est aussi retrouvé en mélange avec les adjuvants AS01 ou AS02 combinés à la saponine QS-21



(Mount et al., 2013). Des essais cliniques de phase III pour un vaccin anti-malaria contenant de l'AS01 ont été réalisés (Agnandji et al., 2012).

La stimulation des CPAs par la protéine Ov-ASP-1 d'*Onchocerca volvulus*, un helminthe, est dépendante de TLR 2 et TLR 4 à la fois (He et al., 2009). Par contre, la protéine la plus étudiée/connue pour activer un TLR est la flagelline qui, tel que mentionné, a comme ligand le TLR 5 (Mizel and Bates, 2010). Elle peut néanmoins activer l'inflammasome quand présente dans la cellule (Lightfield et al., 2008). De part son habileté à stimuler la réponse innée, la flagelline peut être utilisée comme adjuvant, fusionnée ou pas à divers antigènes (Mizel and Bates, 2010). Le développement d'un vaccin anti-grippal (fusion entre la flagelline de *Salmonella thyphimurium* (*S. thyphimurium*) et l'ectodomaine de la protéine de matrice M2e) est en phase clinique II (Talbot et al., 2010; Turley et al., 2011). Une étude de phase I a montré l'efficacité d'un vaccin anti-grippal constitué de la flagelline de *S. thyphimurium* fusionnée à l'hémagglutinine (VAX125) (Taylor et al., 2011). Les dérivés d'imidazoquinolone, Imiquimod et Resiquimod quant à eux activent le TLR 7 et/ou TLR 8. Ils sont cependant à un stade moins avancé de recherche en tant qu'adjuvants (Vasilakos and Tomai, 2013). Les CpG-ODN qui activent le TLR 9 sont en cours d'évaluation dans de nombreux essais cliniques. Le CpG-7909 est en étude de phase I pour un vaccin contre la malaria (Ellis et al., 2012). L'adjuvant AS15 (un mélange de CpG-7909, MPL et de saponine QS-21) est actuellement en essais cliniques pour différents vaccins anti-cancer (Hamilton et al., 2012; Kruit et al., 2013).

Tel que démontré précédemment, la partie C-terminale de P97 (P97c), en fusion avec des protéines d'origine virale et délivrée par des adénovecteurs, a augmenté de manière substantielle la réponse en anticorps spécifiques de ces protéines virales dans un modèle murin, indiquant un effet adjuvant potentiel de P97c (Roques et al., 2013). De plus, la stimulation de DCs originant de la moelle osseuse



de souris à un autre type de P97c en fusion avec la glutathione S-transférase (GST) (Okamba et al., 2010) a résulté en une production significative d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , deux cytokines pro-inflammatoires associées à l'immunité innée qui elle-même est un prélude à la stimulation d'une immunité adaptative (Roques É, Segura M., Archambault D., résultats non publiés). Sur la base de ces prémisses, il devenait donc impératif d'obtenir une préparation relativement pure de la P97c non seulement pour une utilisation simple de la P97c comme adjuvant en mélange avec des immunogènes d'intérêt mais pour aussi initier des études ultérieures visant à comprendre le mécanisme d'action de cette protéine comme adjuvant.

Dans cette étude, la P97c a été exprimée dans deux vecteurs différents chez *E. coli*. L'expression dans des bactéries constitue le système de biosynthèse le moins cher et le plus défini (Nuc and Nuc, 2005). Toutefois, une expression élevée de protéines étrangères dans les bactéries peut se traduire par leur agrégation et leur accumulation dans des corps d'inclusion. Cela peut être dû à un taux de traduction de protéines qui dépasse la capacité de la cellule à plier correctement les protéines nouvellement synthétisées (Kiefhaber et al., 1991). Une façon de réduire les corps d'inclusion consiste à réduire le taux de traduction de la protéine par induction de l'expression à une température inférieure (Strandberg and Enfors, 1991). Ici les protéines recombinantes de *M. hyopneumoniae* exprimées dans *E. coli* et fusionnées à leur extrémité C-terminale avec un 6 x His-tag étaient essentiellement insolubles lorsque les conditions d'expression se faisaient à 37°C. L'induction à 25°C dans le vecteur pET-21b (+) a été testée, mais l'utilisation de cette température plus basse n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression des protéines solubles (données non présentées). Une autre façon de réduire les corps d'inclusion est de contrôler le pH. Une étude a notamment démontré que la quantité de corps d'inclusion augmente avec la diminution du pH (Strandberg and Enfors, 1991). Par contre cet aspect n'a pas été abordé dans cette présente étude.

L'expression de la P97c dans le vecteur pET-21b (+) a induit la production de plusieurs fragments de protéines clivées (37, 25, 20 et 18 kDa) dans le surnageant des bactéries Rosetta Gami après la lyse totale (Fig. 6A). Plusieurs fragments ont aussi été obtenus suite à la purification des protéines solubles du surnageant par une colonne de résine Histidine chargée Ni (Fig. 6D et E). Un gel SDS-PAGE de la purification coloré au bleu de Coomassie a montré des bandes à une intensité très faible (Fig. 6C), ce qui suggère une faible quantité de protéines produites analysée qualitativement. Ainsi il y avait un risque de perdre la faible quantité de protéines obtenues pendant les manipulations suivantes de séparation. Pour cela, l'expression de la P97c a été refaite dans le vecteur pET-22b (+). Ce vecteur est caractérisé par la présence d'une séquence signal qui permet l'expression des protéines au niveau de l'espace périplasmique des bactéries. Une telle expression permet la protection de la protéine cible des contaminants et des dégradations par les protéases. Elle permet aussi un rendement de production suffisant et une purification facile (Yoon et al., 2010). L'expression dans le vecteur pET-22b (+) a induit la production de deux fragments de protéines (37 et 25 kDa) dans le surnageant des bactéries BL21 DE3 après la lyse périplasmique (Fig. 7B). En effet, des bandes de forte intensité ont été obtenues sur le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 7C) après la purification des protéines solubles du surnageant sur une colonne de résine His chargée Ni, ce qui indique une quantité plus grande de protéines produites. Cette observation n'a été que qualitative en comparant l'intensité des bandes obtenues par la migration d'un volume égale de protéines éluées sur les gels de Coomassie (Fig. 6C et Fig. 7C). Pour augmenter davantage la quantité des protéines solubles, une sonication a été réalisée après la lyse des bactéries BL21 DE3. Cette méthode a été efficace sur la quantité de protéines solubles exprimées à partir du vecteur pET-22b (+). Par contre, il n'y a pas eu moyen de le confirmer dans le cas du vecteur pET-21b (+) puisque l'expression des protéines était trop faible tel que visualisée par un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (données non présentées).

Contrairement à l'étude de (Simionatto et al., 2010), la dialyse des protéines lyophilisées originant de la lyse périplasmique n'a pas permis dans nos expériences leur précipitation. Dans leur étude, le tampon de lyse contenant 8 M d'urée a été efficace pour solubiliser le contenu des corps d'inclusion. Cependant, plusieurs protéines ont précipité lorsque l'urée a été enlevée par dialyse. Ces protéines qui étaient devenues totalement insolubles après élimination de l'urée ont été solubilisées à nouveau en remplaçant l'urée par 0,2% de N-lauroyl sarcosine comme agent dénaturant. Toutefois, la solubilisation des protéines recombinantes n'a été que partielle puisque leur présence dans le culot du lysat centrifugé a été détectée. Même si le N-lauroyl sarcosine n'a pas été aussi efficace que l'urée à solubiliser les protéines, ce produit a permis de garder les protéines solubles en solution après son élimination par dialyse. Dans cette même étude, le triton X-100 (0,05%) a aussi été utilisé comme co-solvant au cours de la dialyse. Le triton X-100 a amélioré le repliement des protéines solubilisées avec de l'urée, alors que la ré-agrégation était plus prononcée lorsque ce détergent n'a pas été utilisé (Simionatto et al., 2010).

La lyophilisation ou le séchage par congélation est la méthode la plus utilisée pour préparer la protéine pour un stockage à long terme lorsque le produit protéique n'est pas suffisamment stable en solution aqueuse. Cependant, souvent les phases de congélation et de séchage de la lyophilisation endommagent de façon irréversible la protéine. Le dommage se manifeste par une dénaturation et une agrégation lors de la réhydratation de l'échantillon de protéines (Dong et al., 1995). L'agrégation ou la précipitation des protéines peut être réversible ou irréversible. L'agrégation réversible aura lieu lorsque la concentration de la protéine dépasse sa limite de solubilité. Dans ce cas, une dilution est suffisante pour ré-solubiliser les agrégats. Les agrégats irréversibles sont les protéines qui ne se dissocient pas en leur forme native lorsqu'elles sont diluées. Pour cela, l'addition de surfactants (ex. polyéthylène glycol), l'ajustement de la température, l'ajustement du pH et l'ajustement de la force



ionique sont des moyens rapportés pour augmenter la solubilisation (Chang and Yeung, 2010).

Dans cette étude, les deux fragments de la P97c (37 et 25 kDa) obtenus dans le surnageant des bactéries BL21 DE3 suite à l'expression par le vecteur pET-22 b (+) et à la lyse périplasmique ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique. La phase mobile a été le tampon PBS dans lequel les fragments protéiques étaient solubles. L'échantillon a traversé la colonne à un débit de 1 ml/min et les fragments ont été ainsi séparés. Le premier pic obtenu (Fig. 9A) correspond aux agrégats des deux fragments (37 et 25 kDa) qui sont élués dans le volume mort de la colonne. Ce résultat a été confirmé par un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Fig. 9B) et par immunobuvardage (Fig. 9C). Les deuxièmes et troisièmes pics correspondent respectivement aux fragments de 37 et 25 kDa. Les mêmes résultats de séparation par chromatographie d'exclusion stérique ont été obtenus à partir de la lyse totale des bactéries BL21 DE3 (résultats non montrés). Ainsi, les protéines issues de la lyse totale et de la sonication ont été utilisées dans les tests *in vitro* parce que cette méthode a été plus rapide que celle de la lyse périplasmique avec un rendement de protéines élevé et sans précipitation.

Afin de déterminer le repliement et la conformation des protéines P97c (37 kDa et 25 kDa), une analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) a été réalisée dans un tampon PBS 1X. Le spectre obtenu (Fig. 10) a montré une conformation désordonnée pour le fragment de 37 kDa de la P97c et une conformation en hélice- $\alpha$  pour la P97c entière de 25 kDa. Le CD est un outil valable pour montrer les changements de conformation d'une molécule chirale. Il peut être utilisé pour étudier la façon dont la structure secondaire d'une protéine change en fonction de la température ou de la concentration d'agents dénaturants, par exemple, le chlorure de guanidinium ou l'urée. De cette façon, il peut révéler des informations importantes sur la stabilité thermodynamique de la molécule (Makhatadze and



Privalov, 1992). La technique du CD dans des tampons aqueux est toutefois limitée par le fait que certains sels absorbent dans la marge où les conformations structurales de la protéine seront exposées à l'absorption différentielle de la lumière circulaire polarisée. Les tampons phosphate, sulfate, carbonate et acétate sont généralement incompatibles avec le CD sauf s'ils ont été très dilués. En plus de mesurer dans des systèmes aqueux, le CD à UV lointain peut être utilisé dans des solvants organiques, par exemple l'éthanol, le méthanol ou le trifluoroéthanol. Ce dernier a l'avantage d'agir sur la formation de la structure des protéines, induisant principalement des hélices alpha qui n'auraient pas été montrées dans des conditions normales aqueuses (Kelly et al., 2005). Le CD peut aussi être réalisé en présence de glycosaminoglycane. En effet, plusieurs études ont montré l'effet de l'héparine sur la conformation des protéines (Bourgault et al., 2011; Carufel et al., 2013).

Pour en comprendre davantage sur les deux fragments de la P97c (25 et 37 kDa), il serait intéressant de faire une spectrométrie de masse (MS). C'est une technique de chimie analytique qui permet d'identifier la quantité et le type de produits chimiques présents dans un échantillon en mesurant le rapport masse/charge ( $m/z$ ) et l'abondance des ions en phase gazeuse. Elle est aussi une méthode importante pour la caractérisation et le séquençage de protéines (de Hoffmann, 1996). Le séquençage des deux fragments aiderait à déterminer le site de clivage en acides aminés de la forme complète (37 kDa) en forme tronquée (25 kDa) à plus ou moins 10 résidus. En plus, la masse moléculaire exacte de ces deux formes peut être mesurée puis comparée à la littérature. Par exemple, le fragment 25 kDa peut être comparé à la portion C-terminale de la P97 contenant la région R2 (P28) et le fragment 37 kDa peut être comparé à la P97 excluant la P28 en C-terminal (P70) (Djordjevic et al., 2004).

Des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire avaient indiqué la production robuste de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) dans le

surnaissant des DCs murines exposées à un type de P97c exprimée en fusion avec la GST chez les bactéries (Roques et al., 2013). Ici, des DCs ont été différenciées et stimulées avec plusieurs doses de la P97c complète. Les témoins positifs utilisés (CpG et LPS) ont permis la production de d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les DCs. Nos résultats sont semblables à ceux d'une étude qui a montré que les CpG ODN et le LPS stimulent les DCs et provoquent la production d'IL-12, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Sparwasser et al., 1998). La flagelline qui a été utilisée comme témoin positif n'a pas induit la sécrétion de l'IL-6 et faiblement la production de TNF- $\alpha$  par les DCs stimulées. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les DCs matures dérivées de la moelle osseuse de souris expriment un taux relativement faible du récepteur TLR 5 (Datta et al., 2003). Cela a été confirmé par une autre étude qui a démontré que des macrophages et certaines DCs de souris exprimaient un faible niveau de TLR 5 (Applequist et al., 2002). Selon les résultats préliminaires, la P97c pourrait donc être reconnue par un autre TLR extracellulaire. Cette suggestion est basée sur les résultats obtenus dans cette étude où la P97c a été capable d'induire la production d'IL-6. Nos résultats ont montré aussi un niveau d'expression de l'IL-6 plus élevé que celui de TNF- $\alpha$ . Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque des DCs stimulées par le LPS ont produit des taux de l'IL-6 plus prononcés que ceux du TNF- $\alpha$  (Collins et al., 2014). Cela pourrait suggérer que le TNF- $\alpha$  requiert une concentration plus élevée du ligand pour être sécrété (Acton, 2013). Toutefois, les résultats obtenus et cités plus haut avec un autre type de P97c en fusion avec la GST avaient démontré une très bonne production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . La différence dans la production de TNF- $\alpha$  par notre P97c et la P97c-GST pourrait être attribuée à la fusion des protéines, ce qui pourrait stabiliser la P97c et aussi faciliter sa liaison à un ligand extracellulaire permettant l'activation du gène codant pour le TNF- $\alpha$ . Cette hypothèse reste à être confirmée.

La P97c bien qu'étant très immunogénique a été considérée comme un candidat potentiel dans le développement d'adjuvants. Des expériences faites dans

notre laboratoire ont démontré que des souris immunisées par des adénovecteurs exprimant la P97c, la capside (Cap) [protéine du circovirus porcin de type 2], la P97c-Cap ou Cap-P97c ont développées des anticorps spécifiques à la P97c de type IgG1 (réponse de type Th2) et IgG2a, IgG2b et IgG3 (réponse de type Th1) démontrant l'immunogénicité de la P97c. De plus, la fusion et l'orientation de la P97c à Cap n'ont pas eu d'impact sur la réponse en anticorps contre la P97c mais a été importante dans l'obtention d'une meilleure réponse en anticorps neutralisants contre le virus. La meilleure réponse en anticorps avait été obtenue chez le groupe de souris immunisées avec la P97c-Cap lorsque comparée avec les groupes immunisés avec la Cap-P97c ou Cap seule (Roques et al., 2013). Ces résultats ont démontré l'importance de la fusion et de l'orientation de la protéine Cap à la P97c dans la réponse immunitaire.

L'utilisation de protéines recombinantes en fusion avec un ligand spécifique à un TLR (ex. la flagelline spécifique au TLR 5) représente une stratégie potentiellement utile dans le développement de nouveaux vaccins (Huleatt et al., 2007). Une étude différente de la nôtre a montré que dans les sérums de souris immunisées avec des adénovirus recombinants défectifs pour la réplication exprimant une portion C-terminale de la P97 (rAdP97c) par voie intra-nasale et intramusculaire, des IgG1 et IgG2a spécifiques de P97c ont été détectés de manière significative. Une analyse des isotypes d'IgG spécifiques de P97c dans les fluides de lavage broncho-alvéolaires a également révélé que des IgG1 et IgG2a ont été essentiellement induits. Ces résultats suggèrent que la réponse de type Th1 et/ou Th2 contre la P97c, chez des souris immunisées par les rAdP97c, est modulée par la voie d'immunisation. L'immunisation par la voie intramusculaire semble favoriser une réponse de type Th1 contre P97c, tandis que la voie intra-nasale induit plutôt une réponse mixte de type Th1/Th2 dans les deux compartiments systémiques et mucosaux (Okamba et al., 2007). Des résultats similaires dans une étude faite chez le porc ont été observés (Okamba et al., 2010).



L'effet adjuvant de la P97c pourrait être déterminé *in vivo* chez des souris par différentes voies d'immunisation. Outre les voies intra-nasale et intramusculaire déjà citées, les voies sous-cutanée et intra-péritonéale peuvent être étudiées (Kool et al., 2008; Zhang et al., 2001). Il serait également intéressant de déterminer le rôle adjuvant des régions R1 et R2 de la P97c seules ou en fusion avec un modèle antigénique connu comme l'ovalbumine (Girard et al., 2011). Les séquences en acides aminés des régions R1 et R2 peuvent être produites synthétiquement, ou les gènes codant ces régions peuvent être amplifiés par PCR, clonés dans un vecteur d'expression, exprimés dans un système procaryote, et les protéines purifiées (Chen et al., 2006; Feng et al., 2010). Une fois les protéines purifiées, des DCs peuvent être stimulées par ces motifs et la sécrétion de cytokines pourrait être déterminée par ELISA. Par la suite, les fragments associées aux régions R1 et/ou R2 pourraient être analysées *in vivo* dans un modèle antigénique.



## CONCLUSION

Le but de cette étude a été de cloner le gène codant la P97c dans un vecteur d'expression chez *E. coli*, d'exprimer la protéine P97c et la purifier afin de caractériser son pouvoir immunomodulateur *in vitro*.

Cette étude a permis de démontrer que l'expression de la P97c dans le vecteur pET-21b (+) a généré plusieurs fragments de protéines clivées majoritairement présents dans les corps d'inclusion. Par comparaison qualitative, le rendement des protéines solubles a été faible et insuffisant pour la poursuite des expériences *in vitro*. D'autre part, l'expression de la P97c dans le vecteur pET-22b (+) a généré deux formes de la protéine (complète et tronquée) qui ont été séparées avec succès par chromatographie d'exclusion stérique et en quantité suffisante pour les expériences *in vitro*. Cette étude a confirmé les résultats obtenus précédemment (Simionatto et al., 2010) en ce qui concerne la précipitation de la P97c pendant ou après la dialyse et suite à une lyophilisation.

Les résultats préliminaires du potentiel de la P97c sur l'activation des DCs et la sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été confirmés dans cette étude. La production d'IL-6 en absence ou en présence de polymyxine B inhibant le LPS a été détectée puis mesurée par ELISA. Le niveau de l'IL-6 a été augmenté graduellement avec l'augmentation de la concentration de la P97c. Le TNF- $\alpha$  a aussi été détecté par la stimulation des DCs avec la P97c en absence de polymyxine B et avec la P97c en présence de polymyxine B à des niveaux plus faibles que l'IL-6.

## ANNEXE A

(A)

Eco RI

GAATTCATGAAGGAATTGGATAATAAAATAAAAGGTATATTGCCTCAGCCCCA  
GCAGCAAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAACAACAAA  
ACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGC  
GGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAC  
CAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCA  
GCAAAACCAGTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAA  
GACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAAT  
TAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCGA  
GTATGAAGAACAAGAAATAATAAAGGAACTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCA  
ATATCAATTCCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCA  
CCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCC  
TAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAGGCGCGCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAAG  
GAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAAGCCCA  
ACTACCGAATTAACATAATTACCTTCCTGACTTAGGTAAAAAATTGACGAAATCA  
TTAAAAACAAGGTAAAAATTGGAAAACAGAGGTTGAACTAATCGAGGATAATA  
TCGCTGGAGATGCTAAATTGCTATACTTTATCCTAAGGGATGATTCAAAATCCGG  
TGATCCTAAAAAATCAAGTCTAAAAGTTAAAAATAACAGTAAACAAAGTAATAA  
TAATCAGGAACCAGAATCTAAACTCGAG

XhoI

(B)

NcoI

CCATGGATATGAAGGAATTGGATAATAAAATAAAAGGTATATTGCCTCAGCCCC  
CAGCAGCAAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAACAACA  
AAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTA  
GCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAA  
ACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAAACCAGTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGA  
AGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAA  
TTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAAGAAATAATAAAGGAACTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTC  
AATATCAATTCCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCC  
ACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTC  
CTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAGGCGCGCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA

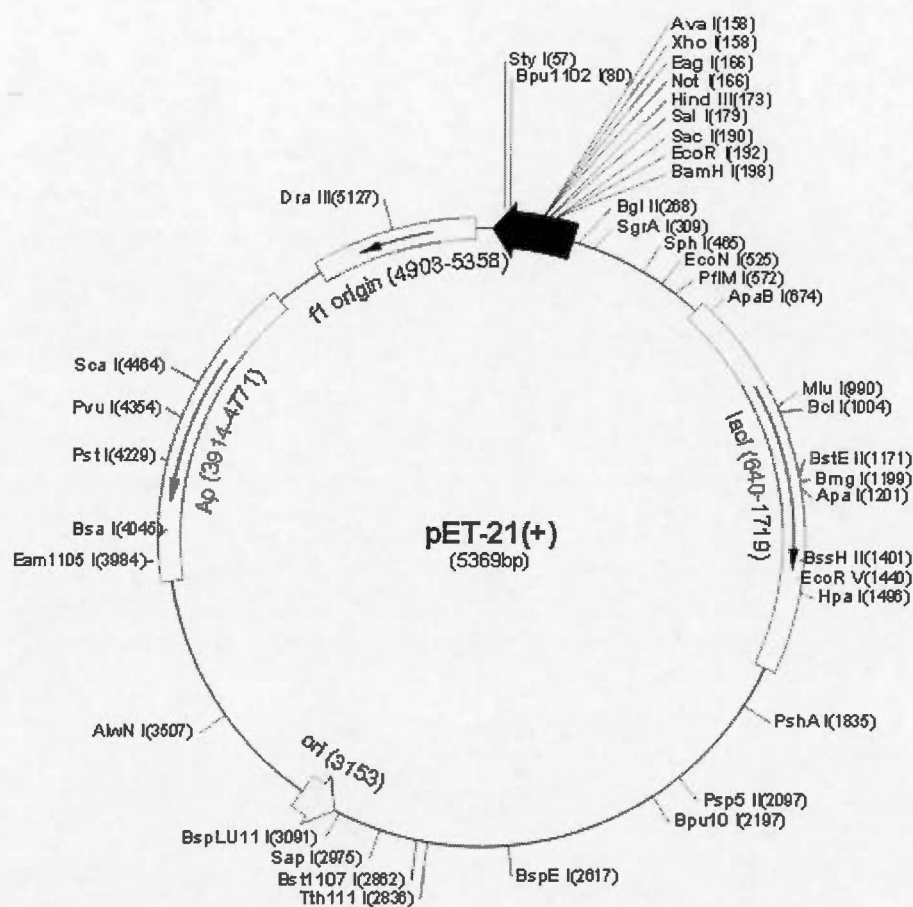
GGAATCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAAGCCC  
 AACTACCGAATTAATAATTACCTTCCTGACTTAGGTAAAAAAATTGACGAAATC  
 ATTAAAAACAAGGTAAAAATTGGAAAACAGAGGTTGAACTAATCGAGGATAAT  
 ATCGCTGGAGATGCTAAATTGCTATACTTTATCCTAAGGGATGATTCAAAATCCG  
 GTGATCCTAAAAAATCAAGTCTAAAAGTTAAAAATAACAGTAAAACAAAGTAATA  
 ATAATCAGGAACCAGAATCTAAA **CTCGAG**

XhoI

**Figure 12. Séquences codant la P97c clonées dans les vecteurs pET-21b (+) et pET-22b (+)**

Les séquences codant la P97c ont été clonées dans le vecteur pET-21b (+) au niveau des enzymes de restriction Eco RI (jaune) et XhoI (rose) (A), et dans le vecteur pET-22b (+) au niveau des enzymes de restriction NcoI (bleue) et XhoI (rose) (B). Les deux acides nucléiques A et T (vert) ont été ajoutés pour ajuster le cadre de lecture. Source : Roques et al., 2013 ; Genbank accession #U50901.1

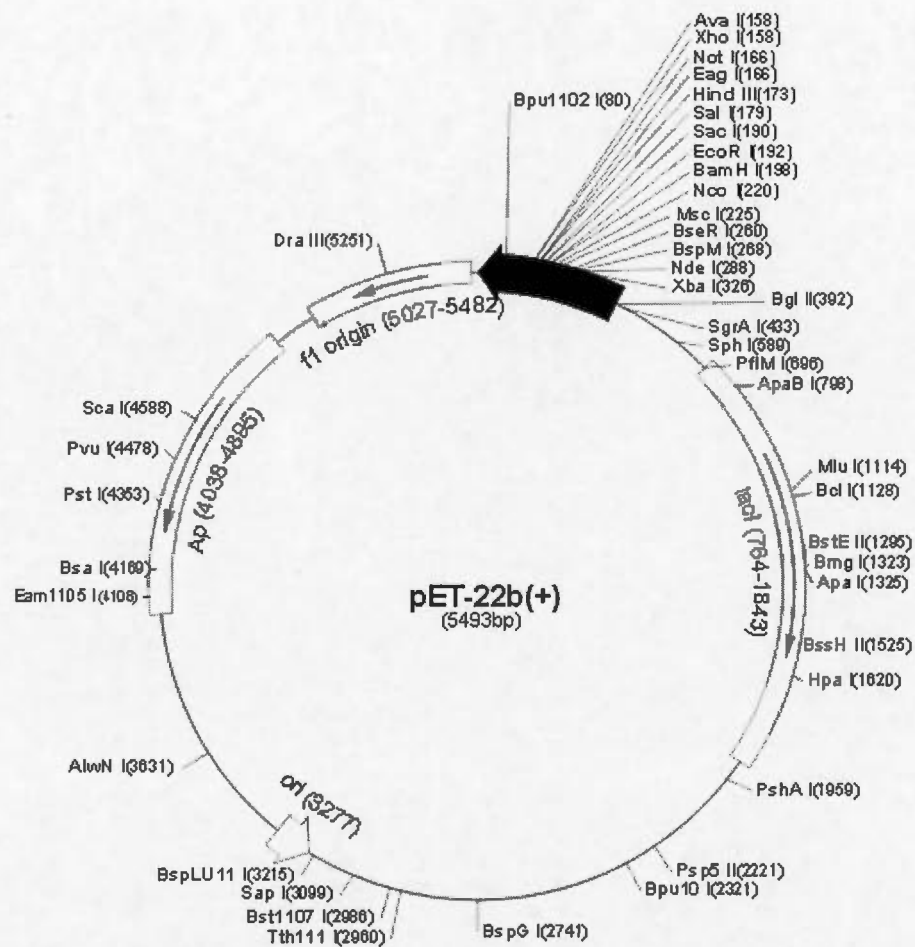
## ANNEXE B



**Figure 13. Carte du vecteur pET-21b (+)**

La carte du vecteur pET-21b (+) montre les sites des enzymes de restriction Eco RI et XhoI où le gène de la P97c a été inséré. Source : Novagen





**Figure 14. Carte du vecteur pET-22b (+)**

La carte du vecteur pET-22b (+) montre les sites des enzymes de restriction NcoI et XhoI où le gène de la P97c a été inséré. Source : Novagen

## ANNEXE C

### Solutions:

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau distillée et déionisée.

#### Milieu L-B (1 L):

10 g Bacto-Tryptone  
5 g Bacto-Yeast Extract  
10 g NaCl  
Ajuster le pH à 7 puis stériliser par autoclave

#### Milieu SOB (1 L):

20 g Bacto-Tryptone  
5 g Bacto-Yeast Extract  
0,5 g NaCl  
10 ml KCl (250 mM)  
Ajuster le pH à 7 puis stériliser par autoclave. Juste avant de l'utiliser, ajouter 5 ml de la solution stérile  $\text{MgCl}_2$  (2 M).

#### Tampon de migration 5X (4 L):

20 g SDS  
60,0 g Tris  
228,3 g glycine  
Diluer à 1X avant chaque utilisation.

#### Tampon de transfert (1 L):

100 ml Tampon de migration 5X  
200 ml Méthanol 100%  
Ajuster le volume jusqu'à 1000 ml

TAE 50X (1 L):

242 g Tris base  
57,1 ml acide acétique glacial  
100 ml EDTA 0,5 M pH 8.0

PBS 10X (1 L):

80 g NaCl  
2 g KCl  
14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Ajuster le pH à 7,4 puis diluer à 1X avant chaque utilisation.

Colonne de terre diatomée:

1. Resuspendre 2 g de terre diatomée dans 40 ml de H<sub>2</sub>O dans un falcon 50 ml et bien mélanger
2. Laisser reposer à 4°C pendant 2 heures
3. Aspirer le surnageant contenant les fines particules
4. Ajouter 40 ml de H<sub>2</sub>O et bien mélanger
5. Répéter les étapes 2, 3 et 4 puis conserver à 4°C.

## RÉFÉRENCES

Acton, Q.A., 2013. Antimicrobial Cationic Peptides—Advances in Research and Application. Scholarly Brief Editions.

Adams, C., Pitzer, J., Minion, F.C., 2005. In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralogs families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 73, 7784-7787.

Agnandji, S.T., Lell, B., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Methogo, B.G., Kabwende, A.L., Adegnika, A.A., Mordmuller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspá, M., Aponte, J.J., Machevo, S., Acacio, S., Bulo, H., Sigauque, B., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Minja, R., Mpina, M., Ahmed, S., Ali, A.M., Mtoro, A.T., Hamad, A.S., Mutani, P., Tanner, M., Tinto, H., D'Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Bihoun, B., Guiraud, I., Kabore, B., Sombie, O., Guiguemde, R.T., Ouedraogo, J.B., Hamel, M.J., Kariuki, S., Onoko, M., Odero, C., Otieno, K., Awino, N., McMorro, M., Muturi-Kioi, V., Laserson, K.F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Otsyula, N., Gondi, S., Otieno, A., Owira, V., Oguk, E., Odongo, G., Woods, J.B., Ogutu, B., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Bejon, P., Marsh, K., Mwambingu, G., Owusu-Agyei, S., Asante, K.P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Kwara, E., Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Mahende, C., Liheluka, E., Malle, L., Lemnge, M., Theander, T.G., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei, S., Boateng, H.O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Sarfo, A., Agyekum, A., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Tembo, T., Tegha, G., Tsidya, M., Kilembe, J., Chawinga, C., Ballou, W.R., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Olivier, A., Vekemans, J., Carter, T., Kaslow, D., Leboulleux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M., Vansadia, P., 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 367, 2284-2295.

Aguilar, J.C., Rodriguez, E.G., 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25, 3752-3762.

Akira, S., 2003. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278, 38105-38108.

Akira, S., 2011. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2748-2755.



Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Alving, C.R., Peachman, K.K., Rao, M., Reed, S.G., 2012. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 24, 310-315.

Amjadi, F., Salehi, E., Mehdizadeh, M., Aflatoonian, R., 2014. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv Biomed Res* 3, 1.

Applequist, S.E., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., 2002. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14, 1065-1074.

Aucouturier, J., Ascarateil, S., Dupuis, L., 2006. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine* 24, Suppl 2, S44-S45.

Audibert, F.M., Lise, L.D., 1993. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today* 14, 281-284.

Balamayooran, T., Balamayooran, G., Jeyaseelan, S., 2010. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun* 16, 201-210.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G.B., 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sc (USA)* 98, 9237-9242.

Behboudi, S., Morein, B., Ronnberg, B., 1995. Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms. *Vaccine* 13, 1690-1696.

Beutler, B., 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12, 20-26.

*Beutler, B.A., 2009. TLRs and innate immunity. Blood 113, 1399-1407.*

Binder, S., Levitt, A., Sacks, J., Hughes, J., 1999. Emerging infectious diseases: public health issues for the 21st century. *Science* 284, 1311-1313.

Bitter, G.A., Egan, K.M., Burnette, W.N., Samal, B., Fieschko, J.C., Peterson, D.L., Downing, M.R., Wypych, J., Langley, K.E., 1988. Hepatitis B vaccine produced in yeast. *J Med Virol* 25, 123-140.

Bogema, D.R., Deutscher, A.T., Woolley, L.K., Seymour, L.M., Raymond, B.B., Tacchi, J.L., Padula, M.P., Dixon, N.E., Minion, F.C., Jenkins, C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2012. Characterization of Cleavage Events in the Multifunctional Cilium Adhesin Mhp684 (P146) Reveals a Mechanism by Which *Mycoplasma hyopneumoniae* Regulates Surface Topography. *mBio* 3, Suppl 2: e00282-11.

Bourgault, S., Solomon, J.P., Reixach, N., Kelly, J.W., 2011. Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion. *Biochemistry* 50, 1001-1015.

Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., Mantovani, A., 2003. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102, 956-963.

Bradney, C.P., Sempowski, G.D., Liao, H.-X., Haynes, B.F., Staats, H.F., 2002. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. *J Med Virol* 76, 517-524.

Brewer, J.M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., Alexander, J., 1996. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Europ J Immunol* 26, 2062-2066.

Browning, G.F., Marends, M.S., Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., 2011. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet Microbiol* 153, 44-50.

Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., Pali-Scholl, I., 2010. The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview. *Immunol Lett* 128, 29-35.

Bungener, L., Serre, K., Bijl, L., Leserman, L., Wilschut, J., Daemen, T., Machy, P., 2002. Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* 20, 2287-2295.

Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S.J., Geary, S., Liao, X., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* 60, 669-686.

Buskas, T., Thompson, P., Boons, G.J., 2009. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chem Commun*, 5335-5349.

Butler, N.R., Voyce, M.A., Burland, W.L., Hilton, M.L., 1969. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Brit Med J* 1, 663-666.

Byars, N., Allison, A., 1990. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations. *Lab Meth Immunol*, 39-51.

Cardoso, L.S., Araujo, M.I., Góes, A.M., Pacífico, L.G., Oliveira, R.R., Oliveira, S.C., 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* 6, 1-6.

Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., Delneste, Y., 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 175, 1551-1557.

Carufel, C.A., Nguyen, P.T., Sahnouni, S., Bourgault, S., 2013. New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity. *Pept Sci* 100, 645-655.

Chae, C., 2011. Vaccinating pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection: failure to prevent transmission. *Vet J* 188, 7-8.

Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., Delneste, Y., 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778-1783.

Chang, B.S., Yeung, B., 2010. Physical stability of protein pharmaceuticals. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, USA. Editors: Jameel & Hershenson, 69-104.

Chen, A.Y., Fry, S.R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G., Mukkur, T.K., 2006. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J Med Microbiol* 55, 923-929.

Chen, J.R., Liao, C.W., Mao, S.J., Weng, C.N., 2001. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Vet Microbiol* 80, 347-357.

Chen, Y.C., Giovannucci, E., Kraft, P., Lazarus, R., Hunter, D.J., 2007. Association between Toll-like receptor gene cluster (TLR6, TLR1, and TLR10) and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1982-1989.



- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492-503.
- Collins, L.E., DeCoursey, J., Rochfort, K.D., Kristek, M., Loscher, C.E., 2014. A Role for Syntaxin 3 in the secretion of IL-6 from Dendritic Cells following activation of Toll-like Receptors. *Front Immunol* 5, 691-700.
- Cooper, P.D., 1995. Vaccine adjuvants based on gamma inulin, *Pharm Biotechnol* 6, 559-580.
- Cooper, P.D., McComb, C., Steele, E.J., 1991. The adjuvanticity of Algamulin, a new vaccine adjuvant. *Vaccine* 9, 408-415.
- Cooper, P.D., Steele, E.J., 1991. Algamulin, a new vaccine adjuvant comprising gamma inulin particles containing alum: preparation and in vitro properties. *Vaccine* 9, 351-357.
- Corridoni, D., Arseneau, K.O., Cifone, M.G., Cominelli, F., 2014. The dual role of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Front Immunol* 5, 317.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T.P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Brière, F., Trinchieri, G., Biron, C.A., 2002. Interferon  $\alpha/\beta$  and Interleukin 12 Responses to Viral Infections Pathways Regulating Dendritic Cell Cytokine Expression In Vivo. *J Exp Med* 195, 517-528.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 170, 4102-4110.
- Datta, S.K., Sabet, M., Nguyen, K.P.L., Valdez, P.A., Gonzalez-Navajas, J.M., Islam, S., Mihajlov, I., Fierer, J., Insel, P.A., Webster, N.J., 2010. Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sc (USA)* 107, 10638-10643.
- de Hoffmann, E., 1996. Tandem mass spectrometry: a primer. *J Mass Spect* 31, 129-137.
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62, 5312-5318.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., Deen, J., 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* 40, 39.



Desrosiers, R., 2011. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Anim Health Res Rev* 12, 1-13.

Deutscher, A.T., Jenkins, C., Minion, F.C., Seymour, L.M., Padula, M.P., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2010. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol* 78, 444-458.

Dhodapkar, M.V., Krasovsky, J., Steinman, R.M., Bhardwaj, N., 2000. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8<sup>+</sup> T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* 105, R9-R14.

Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Van Mechelen, M., Garcon, N., 2009. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 183, 6186-6197.

Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J., Minion, F.C., 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun* 72, 2791-2802.

Dong, A., Prestrelski, S.J., Allison, S.D., Carpenter, J.F., 1995. Infrared spectroscopic studies of lyophilization-and temperature-induced protein aggregation. *J Pharm Sci* 84, 415-424.

Douce, G., Turcotte, C., Cropley, I., Roberts, M., Pizza, M., Domenghini, M., Rappuoli, R., Dougan, G., 1995. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 92, 1644-1648.

Dupuis, M., Murphy, T.J., Higgins, D., Ugozzoli, M., van Nest, G., Ott, G., McDonald, D.M., 1998. Dendritic Cells Internalize Vaccine Adjuvant after Intramuscular Injection. *Cell Immunol* 186, 18-27.

Duthie, M.S., Windish, H.P., Fox, C.B., Reed, S.G., 2011. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* 239, 178-196.

e Sousa, C.R., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., Sher, A., 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.

Edelman, R., 1980. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis* 2, 370-383.

Egan, M.A., Israel, Z.R., 2002. The use of cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Clin Appl Immunol Rev* 2, 255-287.

Ellis, R.D., Wu, Y., Martin, L.B., Shaffer, D., Miura, K., Aebig, J., Orcutt, A., Rausch, K., Zhu, D., Mogensen, A., Fay, M.P., Narum, D.L., Long, C., Miller, L., Durbin, A.P., 2012. Phase 1 study in malaria naive adults of BSAM2/Alhydrogel(R)+CPG 7909, a blood stage vaccine against *P. falciparum* malaria. *PLoS One* 7, e46094.

Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13, 145-154.

Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* 16, 799-809.

Felnerova, D., Viret, J.-F., Glück, R., Moser, C., 2004. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 15, 518-529.

Feng, Z.-X., Shao, G.-Q., Liu, M.-J., Wang, H.-Y., Gan, Y., Wu, X.-S., 2010. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol* 143, 410-416.

Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., Zitvogel, L., 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-411.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., Golenbock, D.T., 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-1055.

Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T.-D., Amer, A., Núñez, G., 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J Immunol* 177, 3507-3513.

Franchi, L., Warner, N., Viani, K., Nunez, G., 2009. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227, 106-128.

Freytag, L.C., Clements, J.D., 2005. Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23, 1804-1813.

Girard, A., Saron, W., Bergeron-Sandoval, L.P., Sarhan, F., Archambault, D., 2011. Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. *Vaccine* 29, 6695-6703.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jéhanho, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zähringer, U., 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003b. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872.

Goldman, M., 2007. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clin Exp Immunol* 147, 208-216.

Gorden, K.B., Gorski, K.S., Gibson, S.J., Kedl, R.M., Kieper, W.C., Qiu, X., Tomai, M.A., Alkan, S.S., Vasilakos, J.P., 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 174, 1259-1268.

Gregoriadis, G., 1998. Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm Res* 15, 661-670.

Gribar, S.C., Anand, R.J., Sodhi, C.P., Hackam, D.J., 2008. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukocyte Biol* 83, 493-498.

Gupta, R.K., Siber, G.R., 1995. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13, 1263-1276.

Hacker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Wagner, H., 2000. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 192, 595-600.

Halpern, M.D., Kurlander, R.J., Pisetsky, D.S., 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* 167, 72-78.

Hamilton, E., Blackwell, K., Hobeika, A.C., Clay, T.M., Broadwater, G., Ren, X.R., Chen, W., Castro, H., Lehmann, F., Spector, N., Wei, J., Osada, T., Lyster, H.K., Morse, M.A., 2012. Phase 1 clinical trial of HER2-specific immunotherapy with concomitant HER2 kinase inhibition. *J Transl Med* 10, 28.

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174, 2942-2950.



Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.

Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.

He, Y., Barker, S.J., MacDonald, A.J., Yu, Y., Cao, L., Li, J., Parhar, R., Heck, S., Hartmann, S., Golenbock, D.T., Jiang, S., Libri, N.A., Semper, A.E., Rosenberg, W.M., Lustigman, S., 2009. Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-biased protein adjuvant derived from the helminth *Onchocerca volvulus*, can directly bind and activate antigen-presenting cells. *J Immunol* 182, 4005-4016.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

Heufler, C., Koch, F., Schuler, G., 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 167, 700-705.

Hidmark, A., von Saint Paul, A., Dalpke, A.H., 2012. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol* 189, 2717-2721.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.

Horwitz, M.A., Lee, B., Dillon, B.J., Harth, G., 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sc (USA)* 92, 1530-1534.

Hsu, T., Artiushin, S., Minion, F.C., 1997. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol* 179, 1317-1323.

Hsu, T., Minion, F.C., 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 66, 4762-4766.

Hua, L.Z., Wu, Y.Z., Bai, F.F., William, K.K., Feng, Z.X., Liu, M.J., Yao, J.T., Zhang, X., Shao, G.Q., 2014. Comparative analysis of mucosal immunity to



*Mycoplasma hyopneumoniae* in Jiangquhai porcine lean strain and DLY piglets. Genet Mol Res 13, 5199-5206.

Huleatt, J.W., Jacobs, A.R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E.B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., Powell, T.J., 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. Vaccine 25, 763-775.

Igartua, M., Hernández, R.M., Esquisabel, A., Gascón, A.R., Calvo, M.B., Pedraz, J.L., 1998. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. J Control Rel 56, 63-73.

Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., Steinman, R.M., 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J Exp Med 172, 631-640.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M., 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 176, 1693-1702.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., Steinman, R., 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. J Exp Med 178, 479-488.

Janeway, C., Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M., 2009. Immunobiologie, 3e éd. / ed. De Boeck, Bruxelles, 1-39.

Jang, E.J., Kim, T.J., 2007. In vitro expression of the 50-kDa and 30-kDa fragments of the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Escherichia coli and their use for serodiagnosis. Can J Vet Res 71, 278-282.

Jenkins, C., Wilton, J.L., Minion, F.C., Falconer, L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. Infect Immun 74, 481-487.

Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., Beutler, B., 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. Nat Immunol 6, 565-570.

Kaisho, T., Akira, S., 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. Biochim Biophys Acta 1589, 1-13.

Kamstrup, S., San Martin, R., Doberti, A., Grande, H., Dalsgaard, K., 2000. Preparation and characterisation of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. Vaccine 18, 2244-2249.

- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., Weissman, D., 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279, 12542-12550.
- Kawai, T., Akira, S., 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19, 24-32.
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-139.
- Kensil, C.R., 1996. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Therap Drug Carr Syst* 13, 1-55.
- Kensil, C.R., Wu, J.Y., Anderson, C.A., Wheeler, D.A., Amsden, J., 1998. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Dev Biol Stand* 92, 41-47.
- Kersten, G.F.A., Crommelin, D.J.A., 2003. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 21, 915-920.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H., Buchner, J., 1991. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Nat Biotechnol* 9, 825-829.
- Klinman, D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 4, 249-259.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., Krieg, A.M., 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93, 2879-2883.
- Kobisch, M., Marois, C., 2008. Les mycoplasmoses porcines. *Bull Acad Vét Fr* 161, 179-184.
- Kool, M., Pétrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I.M., Castillo, R., Lambrecht, B.N., Tschopp, J., 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181, 3755-3759.
- Kovjazin, R., Volovitz, I., Daon, Y., Vider-Shalit, T., Azran, R., Tsaban, L., Carmon, L., Louzoun, Y., 2011. Signal peptides and trans-membrane regions are broadly immunogenic and have high CD8+ T cell epitope densities: Implications for vaccine development. *Mol Immunol* 48, 1009-1018.
- Krieg, A.M., 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest* 117, 1184-1194.

Kruit, W.H., Suci, S., Dreno, B., Mortier, L., Robert, C., Chiarion-Sileni, V., Maio, M., Testori, A., Dorval, T., Grob, J.J., Becker, J.C., Spatz, A., Eggermont, A.M., Louahed, J., Lehmann, F.F., Brichard, V.G., Keilholz, U., 2013. Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 31, 2413-2420.

Kufer, T.A., Sansonetti, P.J., 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* 12, 121-128.

Kumagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S., 2008. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 795-804.

Lambrecht, B.N., Kool, M., Willart, M.A., Hammad, H., 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 21, 23-29.

Lauw, F.N., Caffrey, D.R., Golenbock, D.T., 2005. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 26, 509-511.

Lawson, L.B., Norton, E.B., Clements, J.D., 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol* 23, 414-420.

Lecours, M.P., Gottschalk, M., Houde, M., Lemire, P., Fittipaldi, N., Segura, M., 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* 204, 919-929.

Lecours, M.P., Segura, M., Fittipaldi, N., Rivest, S., Gottschalk, M., 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* 7, e44746.

Lefeber, D.J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J.F., Kamerling, J.P., Jansen, W.T., Kraaijeveld, K., Snippe, H., 2003. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun* 71, 6915-6920.

Leroux-Roels, G., 2010. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28 Suppl 3, C25-36.

Li, X.D., Chen, Z.J., 2012. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *eLife* 1, e00102.

Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., Henry, T., Sun, Y.H., Cado, D., Dietrich, W.F., Monack, D.M., Tsolis, R.M., Vance, R.E., 2008. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 9, 1171-1178.



- Liljeqvist, S., Ståhl, S., 1999. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 73, 1-33.
- Lindblad, E.B., 2004. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. *Vaccine* 22, 3658-3668.
- Liu, P.T., Krutzik, S.R., Modlin, R.L., 2007. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends Mol Med* 13, 117-124.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.
- Ludewig, B., Ehl, S., Karrer, U., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *J Virol* 72, 3812-3818.
- Lynch, J.M., Briles, D.E., Metzger, D.W., 2003. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. *Infect Immun* 71, 4780-4788.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., Verbeke, W., Viaene, J., de Kruif, A., 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine* 17, 1024-1034.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 126, 297-309.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* 18, 104-109.
- Magalhaes, J.G., Philpott, D.J., Nahori, M.A., Jehanno, M., Fritz, J., Le Bourhis, L., Viala, J., Hugot, J.P., Giovannini, M., Bertin, J., Lepoivre, M., Mengin-Lecreulx, D., Sansonetti, P.J., Girardin, S.E., 2005. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Reports* 6, 1201-1207.
- Makhatadze, G.I., Privalov, P.L., 1992. Protein interactions with urea and guanidinium chloride: a calorimetric study. *J Mol Biol* 226, 491-505.
- Maldonado-López, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Moser, M., 1999. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189, 587-592.



Mannhalter, J.W., Neychev, H.O., Zlabinger, G.J., Ahmad, R., Eibl, M.M., 1985. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol* 61, 143-151.

Marois, C., Cariolet, R., Morvan, H., Kobisch, M., 2008. Transmission of pathogenic respiratory bacteria to specific pathogen free pigs at slaughter. *Vet Microbiol* 129, 325-332.

Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V., 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol* 120, 96-104.

Marx, P.A., Compans, R.W., Gettie, A., Staas, J.K., Gilley, R.M., Mulligan, M.J., Yamshchikov, G.V., Chen, D., Eldridge, J.H., 1993. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* 260, 1323-1327.

Mathew, S., Roch, T., Frentsch, M., Lendlein, A., Wischke, C., 2012. Adjuvant effect of microencapsulated NOD ligands studied in a human phagocytic cell line. *J Appl Biomater Funct Mat* 10, 229-236.

Matsumoto, M., Seya, T., 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60, 805-812.

Mayordomo, J., Zorina, T., Storkus, W., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L., Melief, C., Ildstad, S., Kast, W.M., Deleo, A., 1995. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1, 1297-1302.

McElrath, M.J., 1995. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Semin Cancer Biol* 6, 375-385.

McGeachy, M.J., Cua, D.J., 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28, 445-453.

Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A., Luster, A.D., 2003. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 5165-5175.

Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T., 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68, 3056-3060.

Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* 186, 7123-7133.

Mizel, S.B., Bates, J.T., 2010. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 185, 5677-5682.

Mizel, S.B., West, A.P., Hantgan, R.R., 2003. Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J Biol Chem* 278, 23624-23629.

Mosmann, T.R., Sad, S., 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146.

Mount, A., Koernig, S., Silva, A., Drane, D., Maraskovsky, E., Morelli, A.B., 2013. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. *Expert Rev Vaccines* 12, 733-746.

Nahori, M.A., Fournie-Amazouz, E., Que-Gewirth, N.S., Balloy, V., Chignard, M., Raetz, C.R., Saint Girons, I., Werts, C., 2005. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 175, 6022-6031.

Novagen pET system manual 2003, pET system manual, Edition: 10<sup>th</sup>, 1-68.

Nuc, P., Nuc, K., 2005. [Recombinant protein production in *Escherichia coli*]. *Postepy biochemi* 52, 448-456.

Okamba, F.R., Arella, M., Music, N., Jia, J.J., Gottschalk, M., Gagnon, C.A., 2010. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine* 28, 4802-4809.

Okamba, F.R., Moreau, E., Cheikh Saad Bouh, K., Gagnon, C.A., Massie, B., Arella, M., 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clin Vaccine Immunol* 14, 767-774.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T., 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161-167.

Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* 145, 198-208.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 97, 13766-13771.

Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 329-347.

Park, J.-H., Kim, Y.-G., McDonald, C., Kanneganti, T.-D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N., Nunez, G., 2007a. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 178, 2380-2386.

Park, J.-H., Kim, Y.-G., Shaw, M., Kanneganti, T.-D., Fujimoto, Y., Fukase, K., Inohara, N., Núñez, G., 2007b. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol* 179, 514-521.

Peiser, M., Wanner, R., Kolde, G., 2004. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J Leukocyte Biol* 76, 616-622.

Pendarvis, K., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Petersen, A.C., Djordjevic, S.P., Burgess, S.C., Minion, F.C., 2014. Proteogenomic mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* virulent strain 232. *BMC genomics* 15, 576.

Pepponi, I., Stylianou, E., van Dolleweerd, C., Diogo, G.R., Paul, M.J., Drake, P.M., Ma, J.K., Reljic, R., 2013. Immune-complex mimics as a molecular platform for adjuvant-free vaccine delivery. *PLoS One* 8, e60855.

Perez, O., Batista-Duharte, A., Gonzalez, E., Zayas, C., Balboa, J., Cuello, M., Cabrera, O., Lastre, M., Schijns, V.E., 2012. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Braz J Med Biol Res* 45, 681-692.

Petrovsky, N., Aguilar, J.C., 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82, 488-496.

Petrovsky, N., Cooper, P.D., 2011. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 10, 523-537.

Pinto, P.M., Klein, C.S., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* 7, 45-56.

Podda, A., Del Giudice, G., 2003. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert Rev Vaccine* 2, 197-204.

Radosevic, K., Rodriguez, A., Mintardjo, R., Tax, D., Bengtsson, K.L., Thompson, C., Zambon, M., Weverling, G.J., Uytdehaag, F., Goudsmit, J., 2008. Antibody and



T-cell responses to a virosomal adjuvanted H9N2 avian influenza vaccine: impact of distinct additional adjuvants. *Vaccine* 26, 3640-3646.

Relyveld, E.H., 1986. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand* 65, 131-136.

Relyveld, E.H., Henocq, E., Raynaud, M., 1964. [Study of the Antidiphtheria Vaccination of Allergic Subjects with a Pure Anatoxin Absorbed on Calcium Phosphate. *Bull World Health Org* 30, 321-325.

Román, B.S., Irache, J.M., Gómez, S., Tsapis, N., Gamazo, C., Espuelas, M.S., 2008. Co-encapsulation of an antigen and CpG oligonucleotides into PLGA microparticles by TROMS technology. *Europ J Pharm Biopharm* 70, 98-108.

Ronnberg, B., Fekadu, M., Behboudi, S., Kenne, L., Morein, B., 1997. Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity. *Vaccine* 15, 1820-1826.

Ronnberg, B., Fekadu, M., Morein, B., 1995. Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine* 13, 1375-1382.

Roques, E., Girard, A., Gagnon, C.A., Archambault, D., 2013. Antibody responses induced in mice immunized with recombinant adenovectors expressing chimeric proteins of various porcine pathogens. *Vaccine* 31, 2698-2704.

Salkowski, C.A., Detore, G.R., Vogel, S.N., 1997. Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect Immun* 65, 3239-3247.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning a laboratory manual, Edition: 2<sup>nd</sup>. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuelsson, P., Hang, L., Wullt, B., Irjala, H., Svanborg, C., 2004. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* 72, 3179-3186.

Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., Sher, A., 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168, 5997-6001.

Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J., Rietschel, E.T., 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbio* 164, 383-389.



Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H.K., Eck, M., 2004. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 136, 521-526.

Schmitz, F., Mages, J., Heit, A., Lang, R., Wagner, H., 2004. Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling. *Europ J Immunol* 34, 2863-2873.

Schöll, I., Boltz-Nitulescu, G., Jensen-Jarolim, E., 2005. Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy. *J Control Rel* 104, 1-27.

Schuler-Thurner, B., Schultz, E.S., Berger, T.G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P.O., Romani, N., 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195, 1279-1288.

Schultze, V., D'Agosto, V., Wack, A., Novicki, D., Zorn, J., Hennig, R., 2008. Safety of MF59™ adjuvant. *Vaccine* 26, 3209-3222.

Seymour, L.M., Deutscher, A.T., Jenkins, C., Kuit, T.A., Falconer, L., Minion, F.C., Crossett, B., Padula, M., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2010. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem* 285, 33971-33978.

Seymour, L.M., Falconer, L., Deutscher, A.T., Minion, F.C., Padula, M.P., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2011. Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem* 286, 10097-10104.

Seymour, L.M., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Raymond, B.B., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Bogema, D.R., Eamens, G.J., Woolley, L.K., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2012. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol* 14, 81-94.

Shanmugam, A., Rajoria, S., George, A.L., Mittelman, A., Suriano, R., Tiwari, R.K., 2012. Synthetic Toll like receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS One* 7, e30839.

Shi, Z., Cai, Z., Wen, S., Chen, C., Gendron, C., Sanchez, A., Patterson, K., Fu, S., Yang, J., Wildman, D., Finnell, R.H., Zhang, D., 2009. Transcriptional regulation of the novel Toll-like receptor Tlr13. *J Biol Chem* 284, 20540-20547.

Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segales, J., 2009a. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* 181, 221-231.

Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009b. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* 181, 221-231.

Silva, D.G., Cooper, P.D., Petrovsky, N., 2004. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunol Cell Biol* 82, 611-616.

Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Hartwig, D.D., Carlessi, R.M., Munari, F.M., Laurino, J.P., Conceicao, F.R., Dellagostin, O.A., 2010. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 69, 132-136.

Siqueira, F.M., Gerber, A.L., Guedes, R.L., Almeida, L.G., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T., Zaha, A., 2014. Unravelling the transcriptome profile of the Swine respiratory tract *Mycoplasmas*. *PLoS One* 9, e110327.

Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., Blanchard, A., 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* 158, 754-766.

Skene, C.D., Sutton, P., 2006. Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods* 40, 53-59.

Smits, E.L., Ponsaerts, P., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F., 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The oncologist* 13, 859-875.

Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680.

Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W., Wagner, H., 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Europ J Immunol* 28, 2045-2054.

Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C., Klinman, D.M., 2011. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29, 3341-3355.

Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Rev Immunol* 21, 685-711.

Strandberg, L., Enfors, S.-O., 1991. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1669-1674.

Straw, B., MacLachlan, N., Corbett, W., Carter, P., Schey, H., 1985. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Canad J Comp Med* 49, 149.

Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S., Germain, R.N., Berzofsky, J.A., 1990. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 344, 873-875.

Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.

Takeshita, F., Leifer, C.A., Gursel, I., Ishii, K.J., Takeshita, S., Gursel, M., Klinman, D.M., 2001. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 167, 3555-3558.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F., Akira, S., 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the *Mycoplasma* 1 lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557.

Talbot, H.K., Rock, M.T., Johnson, C., Tussey, L., Kavita, U., Shanker, A., Shaw, A.R., Taylor, D.N., 2010. Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin. *PLoS One* 5, e14442.

Taylor, D.N., Treanor, J.J., Strout, C., Johnson, C., Fitzgerald, T., Kavita, U., Ozer, K., Tussey, L., Shaw, A., 2011. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine* 29, 4897-4902.

Tekle, Y.I., Nielsen, K.M., Liu, J., Pettigrew, M.M., Meyers, L.A., Galvani, A.P., Townsend, J.P., 2012. Controlling antimicrobial resistance through targeted, vaccine-induced replacement of strains. *PLoS One* 7, e50688.



Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Anim Health Res Rev 5, 317-320.

Turley, C.B., Rupp, R.E., Johnson, C., Taylor, D.N., Wolfson, J., Tussey, L., Kavita, U., Stanberry, L., Shaw, A., 2011. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. Vaccine 29, 5145-5152.

Vajdy, M., Selby, M., Medina-Selby, A., Coit, D., Hall, J., Tandeske, L., Chien, D., Hu, C., Rosa, D., Singh, M., Kazzaz, J., Nguyen, S., Coates, S., Ng, P., Abrignani, S., Lin, Y.L., Houghton, M., O'Hagan, D.T., 2006. Hepatitis C virus polypeptide vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. J Gen Virol 87, 2253-2262.

Valensi, J.P., Carlson, J.R., Van Nest, G.A., 1994. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. J Immunol 153, 4029-4039.

Vasilakos, J.P., Tomai, M.A., 2013. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. Expert Rev Vaccines 12, 809-819.

Verschoor, E.J., Mooij, P., Oostermeijer, H., van der Kolk, M., ten Haaf, P., Verstrepen, B., Sun, Y., Morein, B., Akerblom, L., Fuller, D.H., Barnett, S.W., Heeney, J.L., 1999. Comparison of immunity generated by nucleic acid-, MF59-, and ISCOM-formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in Rhesus macaques: evidence for viral clearance. J Virol 73, 3292-3300.

Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet Microbiol 97, 177-190.

Villarreal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2011. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. Vet J 188, 48-52.

Villasenor-Cardoso, M.I., Frausto-Del-Rio, D.A., Ortega, E., 2013. Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages. BioMed Res Int, doi: 10.1155/2013/562984.

Vogelbruch, M., Nuss, B., Körner, M., Kapp, A., Kiehl, P., Böhm, W., 2000. Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. Allergy 55, 883-887.

Wack, A., Baudner, B.C., Hilbert, A.K., Manini, I., Nuti, S., Tavarini, S., Scheffczik, H., Ugozzoli, M., Singh, M., Kazzaz, J., Montomoli, E., Del Giudice, G., Rappuoli, R., O'Hagan, D.T., 2008. Combination adjuvants for the induction of potent, long-

lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 26, 552-561.

Wagner, H., 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 5, 62-69.

Wang, D., Lou, J., Ouyang, C., Chen, W., Liu, Y., Liu, X., Cao, X., Wang, J., Lu, L., 2010. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 107, 13806-13811.

Wang, J., Lin, D., Peng, H., Shao, J., Gu, J., 2014. Cancer-derived immunoglobulin G promotes LPS-induced proinflammatory cytokine production via binding to TLR4 in cervical cancer cells. *Oncotarget* 5, 9727-9743.

Wilschut, J., 2009. Influenza vaccines: The virosome concept. *Immunol Lett* 122, 118-121.

Wilton, J.L., Scarman, A.L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* 144, 1931-1943.

Xiang, Z., Ertl, H.C., 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2, 129-135.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.

Yoon, S.H., Kim, S.K., Kim, J.F., 2010. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Rec Patents Biotechnol* 4, 23-29.

Zarembek, K.A., Godowski, P.J., 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-561.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S., 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.

Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect Immun 63, 1013-1019.

Zhang, Y., Chirmule, N., Gao, G.-p., Qian, R., Croyle, M., Joshi, B., Tazelaar, J., Wilson, J.M., 2001. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. Mol Therapy 3, 697-707.

Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., Zhang, D., 2014. Toll-like receptors and prostate cancer. Front Immunol 5, 352.

Zurbriggen, R., Novak-Hofer, I., Seelig, A., Glück, R., 2000. IRIV-adjuvanted hepatitis A vaccine: in vivo absorption and biophysical characterization. Prog Lipid Res 39, 3-18.